



# UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINBIOSYNTHESE- AKTIVITÄT HUMANER THROMBOZYTEN

**CHRISTIANE A. DOBROWOLSKI**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger

**und**

dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Betreuer: Prof. Dr. P. Bugert

## **Untersuchungen zur Proteinbiosyntheseaktivität humaner Thrombozyten**

### **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Christiane Angelika Dobrowolski**

Tierärztin aus Iserlohn

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. G. Baljer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Gerstberger  
Herr Prof. Dr. P. Bugert

Tag der Disputation: 29. Mai 2008



---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	4
<b>1.1 Biologie und Physiologie von Thrombozyten</b>	<b>4</b>
1.1.1 Megakaryopoese	6
1.1.2 Synthese der Thrombozyten	7
1.1.3 Morphologie der Thrombozyten	8
1.1.3 Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche	12
<b>1.2 Aufgabe und Wirkung von Thrombozyten</b>	<b>14</b>
1.2.1 Die initiale Funktion der Thrombozyten bei der akuten Gefäßverletzung „primäre Hämostase“ = Adhäsion-Aktivierung-Aggregation	14
1.2.2 Die „sekundäre Hämostase“ – Interaktionen der Thrombozyten im Rahmen der Gerinnungskaskade	17
1.2.3 Der Einfluss der Thrombozyten auf Prozesse im Rahmen der akuten Inflammation	19
1.2.3.1 Thrombozytäre Faktoren und ihre Leistungen im Bereich der Immunabwehr	22
1.2.4 „Nachhaltige Wirkungen“ der aktivierten Thrombozyten	22
<b>1.3 Struktur, Synthese und Funktion von pro IL-1<math>\beta</math>, IL-1<math>\beta</math> und VEGF</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>28</b>
2 MATERIAL UND METHODEN	29
<b>2.1 Material</b>	<b>29</b>
2.1.1 Probenmaterial	29
2.1.2 Chemikalien und Lösungen	30
2.1.2.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen	30
2.1.2.2 Kit-Systeme	31

2.1.2.3	Arbeitsmaterialien.....	31
2.1.2.4	Geräte.....	32
2.1.2.5	Software.....	33
2.2.1	Allgemeine Arbeitsweisen .....	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.2.2	Thrombozytenpräparation für die radioaktive Proteimarkierung mit <sup>35</sup> S-Methionin und Aktivierung mit Thrombin .....	34
2.2.3.1	Herstellung der Thrombozytenfaktorenüberstände.....	38
2.2.3.2	Herstellung der Thrombozytenextrakte.....	40
2.2.3.3	Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin und ADP.....	40
2.2.4	Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2 D-PAGE) .....	41
2.2.4.1	Durchführung der 2 D-PAGE.....	42
2.2.5	Ein-dimensionale Gelelektrophorese (1 D-PAGE).....	45
2.2.5.1	Durchführung der 1 D-PAGE.....	45
2.2.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	46
2.2.6.1	Durchführung der ELISAS.....	47
2.2.6.2	ELISA-Standardkurven.....	51
2.2.7	Statistische Methoden .....	53
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeiner Nachweis von <i>de novo</i> Proteinbiosynthese in Thrombozyten.....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Radioaktive Proteinmarkierung und 2D-PAGE.....	54
3.1.2	Radioaktive Proteinmarkierung und 1D-PAGE.....	56
<b>3.2</b>	<b>Nachweis der <i>de novo</i> Proteinbiosynthese in Thrombozyten anhand von ausgewählten Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Ergebnisse für pro IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>59</b>
3.2.1.1	Die pro IL-1 $\beta$ -Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion.....	60
<b>3.2.2</b>	<b>Ergebnisse für IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>62</b>
3.2.1.2	Die IL-1 $\beta$ -Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion...	62
<b>3.2.3</b>	<b>Ergebnisse für VEGF .....</b>	<b>66</b>
3.2.3.2	Die VEGF-Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion .....	66



3.2.4 Vergleichende Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin und ADP.....	67
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Bedeutung der thrombozytären Proteinbiosynthese für die Wundheilung.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2. Stimulation der Thrombozyten.....</b>	<b>73</b>
<b>4.3 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
4.3.1 Nachweis der de novo Proteinsynthese in Thrombozyten mittels radioaktiver Proteinmarkierung .....	75
4.3.2 Nachweis der de novo Synthese von pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ und VEGF in Thrombozyten .....	76
4.3.2 Thrombozytenstimulation mit Thrombin und ADP .....	78
<b>4.4 Fazit und Ausblick.....</b>	<b>81</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>82</b>
<b>6 SUMMARY</b>	<b>84</b>
<b>7 LITERATUR</b>	<b>86</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>105</b>
<b>9 ERKLÄRUNG</b>	<b>106</b>

---

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

---

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BC	<i>buffy coat</i>
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
Ca	Kalzium
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose; Antikoagulans für Vollblut
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-l-propansulfonat
d.h.	das heißt
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alteri (und andere)
ggf	gegebenenfalls
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HRP	<i>horseradish</i> ; Meerrettichperoxidase
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i> ; intrazelluläres Adhäsionsmolekül

IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IL	Interleukin
INF	Interferon
INT-violet	<i>iodonitrotetrazolium violet</i>
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
Kap.	Kapitel
LAMP	<i>lysosomal associated membrane proteins</i>
Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i> ; Monozyten-chemotaktisches Protein
MEM	<i>minimum essential medium</i>
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MgCl	Magnesiumchlorid
MK	Megakaryozyten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten- Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N	Anzahl haploider Chromosomensätze einer Zelle
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat reduz.
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid reduz.
Nm	Nanometer
OCS	<i>open canalicular system</i> ; offenes Kanalsystem
p	Signifikanz
1D-PAGE	Ein-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

2 D-PAGE	Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
PAF	<i>platelet activating factor</i> ; Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Isotone Zellsuspensionslösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pg	Pikogramm
PH	Plättchenheterogenität
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PLT	<i>platelets</i> ; Thrombozyten
PSGL	P-Selektin Glykoproteinligand
PRP	plättchenreiches Plasma
©	eingetragenes Warenzeichen
RBC	<i>red blood cells</i> ; Erythrozyten
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
Rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
s	Sekunde
s.	siehe
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i> ; Gerinnungsfaktor
TK	Thrombozytenkonzentrat
™	Warenzeichen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel

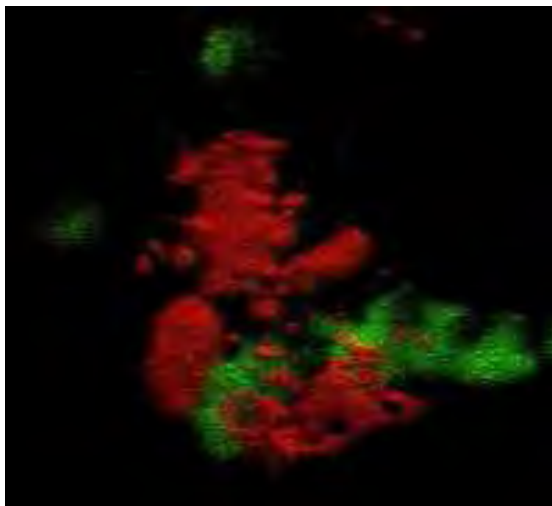
---

## 1 EINLEITUNG

---

Thrombozyten werden auch Blutplättchen genannt und stellen mit einem Durchmesser von nur 2-4  $\mu\text{m}$  die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes dar. Sie konnten erstmals 1842 von Donné mikroskopisch nachgewiesen werden.<sup>59</sup> In späteren Arbeiten von Zhan<sup>285</sup>, Bizzozero<sup>19</sup> und Lubnitzky<sup>157</sup> wurde die Beteiligung der Plättchen bei der Blutstillung (primäre Hämostase) und der Blutgerinnung (sekundäre Hämostase) gezeigt. Zudem haben sie großen Einfluss auf die im Anschluß an die primäre und sekundäre Hämostase folgende Wundheilung. Ihre Funktionen sind vielfältig, so können sie Sauerstoffradikale bilden<sup>157</sup> und chemotaktische Faktoren für neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten abgeben.<sup>53,164</sup> Außerdem weisen sie bakterizide<sup>113</sup> und gegen Blutparasiten<sup>22</sup> und Tumorzellen gerichtete zytotoxische Aktivität auf.<sup>119</sup>

### 1.1 Biologie und Physiologie von Thrombozyten



**Abb.1:** Multiphotonenfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Megakaryozyten (rot) mit *proplatelet*-ähnlichen Ausläufern in Knochenmarksinusoiden (grün) von lebenden Mäusen (20x, MP 2100).<sup>291</sup>

Thrombozyten (PLT, *platelets*) sind bei Säugetieren inklusive dem Menschen kernlose Zellfragmente, die im Knochenmark und im mononukleären Phagozytose-System der Leber und der Milz aus Megakaryozyten entstehen.

Im ruhenden, nicht aktivierten Zustand ist die Gestalt der Plättchen diskoid, bikonkav, mit einem Durchmesser von 2 – 4  $\mu\text{m}$  und einer Höhe von etwa 0,5  $\mu\text{m}$ . Bei gesunden humanen Individuen beträgt die Zahl der Thrombozyten 150.000 – 350.000 pro Mikroliter Blut. Die unterschiedlichen Säuger-

bozyten 150.000 – 350.000 pro Mikroliter Blut. Die unterschiedlichen Säuger-

spezies zeigen jedoch eine weitaus größere Variationsbreite ihrer physiologischen Thrombozytenzahlen (siehe Tabelle 1). Aufgrund der durchschnittlichen Lebensdauer von 11 Tagen ist davon auszugehen, dass pro Tag  $15 - 40 \times 10^9$  PLT im Knochenmark neu gebildet werden.<sup>266</sup>

**Tabelle 1.** Physiologische Referenzbereiche der Thrombozytenzahlen verschiedener Spezies.<sup>179,266</sup>

Spezies	Thrombozyten [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]
Mensch	150 – 350
Hund	150 – 500
Pferd	90 – 300
Rind	300 – 800

Die im peripheren Blut zirkulierenden Thrombozyten befinden sich im „Ruhezustand“. Durch Oberflächenkontakt in verletzten Gefäßen und durch bestimmte Blutgerinnungsfaktoren können sie in den aktivierten Zustand überführt werden. Sie variieren hinsichtlich ihres Volumens, ihrer Dichte und ihrer Reaktivität, was auch als Plättchenheterogenität (PH) bezeichnet wird. Das unterschiedliche Alter der Thrombozyten wird als mögliche Ursache der PH angesehen.<sup>130</sup> Die Thrombopoese steuert die Anzahl und das Volumen der Plättchen im reziproken Verhältnis zueinander.<sup>43</sup> Da große Plättchen über eine höhere Reaktivität verfügen, besteht ein direkter Zusammenhang dieser beiden Merkmale, die möglicherweise auch von pathophysiologischer Bedeutung sind. So konnte bei menschlichen Patienten nach akutem Myokardinfarkt ein erhöhtes Plättchenvolumen festgestellt werden. Darüber hinaus war die verkürzte Blutungszeit bei diesen Patienten ein Indiz für die erhöhte Plättchenreaktivität.<sup>178</sup>

### 1.1.1 Megakaryopoese

Durch Zytokine, v.a. Interleukin-3 und Interleukin-6, und durch den in der Niere sowie auch in der Leber, im Knochenmark und einigen anderen Geweben gebildeten, spezifischen Megakaryozytenwachstumsfaktor „Thrombopoietin“ (TPO), einem aus 332 Aminosäuren bestehenden Glykoprotein, wird die Bildung und Reifung der Megakaryozyten stimuliert.<sup>266</sup> Der TPO-Blutspiegel korreliert in den meisten Fällen umgekehrt proportional mit der Menge an Megakaryozyten und Thrombozyten. Dies bedeutet, eine hohe Anzahl an Thrombozyten hat einen niedrigen TPO-Spiegel zur Folge und umgekehrt.<sup>143,171,193</sup> Dabei wird davon ausgegangen, dass der TPO-Spiegel abhängig von seiner rezeptorvermittelten Aufnahme in die Thrombozyten ist, denn Thrombopoietin wird in Leber und Niere weitgehend konstitutiv exprimiert. Wenn die Thrombozytenzahlen hoch sind, bindet TPO vermehrt an den auf Thrombozyten bzw. auch auf Megakaryozyten vorhandenen c-Mpl-Rezeptor<sup>259</sup> und wird internalisiert. Auf diese Weise hält ein großer Thrombozytenpool den Thrombopoietinspiegel im Plasma niedrig und bremst somit die Megakaryozytenproduktion. Andererseits führt eine Thrombozytopenie zu einer erhöhten Thrombopoietinwirkung im Knochenmark.<sup>145,170,75,247</sup> Zudem können zum Beispiel Entzündungen oder auch Infektionen<sup>235</sup>, Leberversagen<sup>248</sup> oder hämolytische Störungen zu unerwartet hohen oder niedrigen TPO-Spiegeln führen. Es wird davon ausgegangen, dass TPO zum einen die Proliferation primitiver Vorläuferzellen und ihre Ausdifferenzierung zu Megakaryozyten fördert, und zum anderen in den voll ausdifferenzierten Megakaryozyten Endomitosen induziert, die zu einer Polyploidie führen.<sup>122</sup> Diese Polyploidie ist ein besonderes Merkmal der Megakaryozyten. Sie entsteht durch wiederholte DNA-Replikation ohne anschließende Zellteilung.<sup>213,289</sup> Dieser endomitotische Zellzyklus führt zu Zellen, die einen DNA-Gehalt von bis zu 128n haben. Ab einem Stadium von 8n kommt es zur Fragmentierung der polyploiden Zellen in Thrombozyten.<sup>122</sup> Ein direkter Zusammenhang zwischen DNA-Menge, Megakaryozyten-Größe und Thrombozyten-Produktion konnte gezeigt werden.<sup>193,166</sup> So bilden Megakaryozyten mit einem hohen Ploiditäts-Grad mehr Thrombozyten als diejenigen mit einer niedrigen Ploidität. Veränderungen der Ploidität bei einigen Erkrankungen, so zum Beispiel myeloproliferativen Erkrankungen, werden entweder mit ineffektiver oder übermäßiger Thrombozytenproduktion in Verbindung gebracht.<sup>211,142,124,114</sup>

Der Prozess der Polyploidisierung oder auch der sogenannten Endomitose ist charakterisiert durch das Fehlen der Zytokinese am Ende des Zellzyklus.<sup>184,260</sup>

Dabei treten die Megakaryozyten zunächst in die Mitosephase ein, durchlaufen die Prophase und die Anaphase A, jedoch ohne Abschluss der Anaphase B und der Zytokinese.<sup>260,184,289</sup>

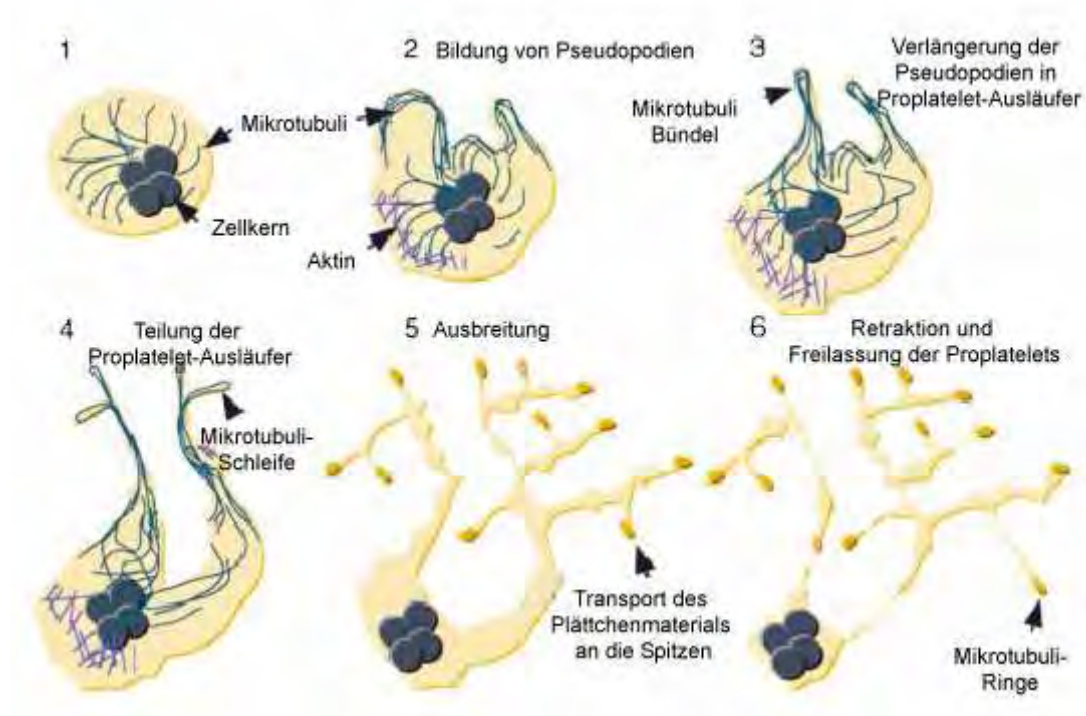
### 1.1.2 Synthese der Thrombozyten

Die Thrombopoese, d. h. die Bildung der Thrombozyten, stellt hierbei das Endstadium der Differenzierung der Megakaryozyten dar. Jeder reife Megakaryozyt bildet hunderte von Thrombozyten und entlässt diese in den Blutkreislauf.<sup>131,249</sup>

Nach Polyploidisierung des Kernmaterials und der Reifung des Zytoplasmas (Abb. 2, Bild 1) wandeln sich die Megakaryozyten in sogenannte „*proplatelets*“ um, einer Zwischenstufe auf dem Weg zum reifen Thrombozyten. Sie konnten erstmals in elektronenmikroskopischen Bildern vom Knochenmarksinus gezeigt werden.<sup>249,11</sup> Die Transformation des Zytoplasmas der Megakaryozyten beginnt mit der Erosion an einem Pol und setzt sich über die gesamte Zelle fort, bis das Zytoplasma vollständig in „*proplatelets*“ umgewandelt ist.<sup>120,121</sup> Zu Beginn der „*proplatelet*-Bildung“ strukturieren die Megakaryozyten ihr Zytoplasma zu dicken Ausläufern, den Pseudopodien (Abb. 2, Bild 2), die direkt an der sich vorwölbenden Plasmamembran Bündel aus Mikrotubuli besitzen. Die Pseudopodien verlängern sich zu „*proplatelet*-Ausläufern“ (Abb. 2, Bild 3). Sie enthalten zahlreiche Bündel aus Mikrotubuli, die parallel zur Längsachse der Pseudopodien verlaufen. Diese Mikrotubuli setzen sich bis in die aufgetriebenen Enden der „*proplatelets*“ fort, bilden eine Schleife und treten wieder in die „*proplatelet*-Schleife“ ein. Die „*proplatelets*“ nehmen wiederholt eine U-förmige Gestalt an und bilden in diesem Bereich aktinvermittelt verzweigte Strukturen aus, aus denen neue Ausläufer hervorgehen (Abb. 2, Bild 4). Bei den „*proplatelet*-Ausläufern“ kommt es zu Einschnürungen, die ihnen eine perlenkettenartige Erscheinung vermitteln (Abb. 2, Bild 5), dabei wird vermutlich Thrombozytenmaterial zur Spitze der Ausläufer transportiert. Sobald sich ein einzelner Mikrotubulus aus den Mikrotubuli-Bündeln ablöst und sich zu einer Spule aufwickelt, um Granula und Organellen in der „*proplatelet*-Spitze“ zurück zuhalten und den reifen Thrombozyten ihre typische diskoide Form zu geben, ist die Reifung der



„proplatelets“ beinahe abgeschlossen. Nach Retraktion des Megakaryozyten erfolgt die Abschnürung der *proplatelets* (Abb. 2, Bild 6).<sup>120</sup> Bisher nicht eindeutig geklärt ist, ob voll entwickelte Thrombozyten oder „proplatelet-Ketten“ in den Blutkreislauf entlassen werden. Gut vorstellbar ist, dass die Thrombozytenreifeung erst in den Gefäßen abgeschlossen wird.<sup>13</sup>

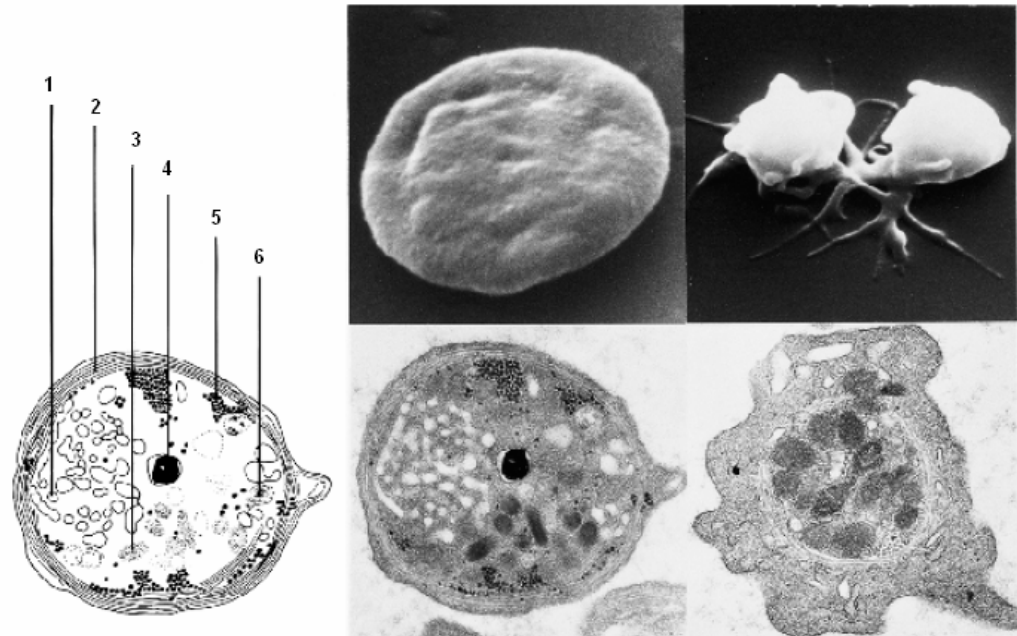


**Abb. 2:** Modell der Thrombozytenproduktion modifiziert nach Italiano et al. 1999.<sup>121</sup> Erklärung der einzelnen Punkte siehe 1.1.2

### 1.1.3 Morphologie der Thrombozyten

Die Thrombozyten<sup>272</sup> werden, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, von den Megakaryozyten in den Blutkreislauf entlassen. Ihre relativ gestaltlose, glatte Oberfläche wird nur durch Membraninvaginationen durchbrochen, welche den Eingang zum komplexen internen Membransystem der Thrombozyten, OCS (*open canalicular system*)<sup>275</sup>, bilden. Sowohl das OCS, als auch die sekretorischen Granula ( $\alpha$ -Granula, dense granules und Lysosomen) werden bereits im Zytoplasma der Megakaryozyten ausgebildet und stellen die ultrastrukturellen

Charakteristika der Thrombozyten dar (Abb.4). Sie beinhalten zahlreiche Faktoren und Rezeptoren mit unterschiedlichen Funktionen.<sup>45,136</sup>



**Abb. 3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines ruhenden diskoiden Thrombozyten (Bild links oben x 20000) und zweier aktivierter Thrombozyten mit Ausstülpung der Zellmembran zu Pseudopodien (Bild rechts oben x 20000). Schematische Darstellung der subzellulären Strukturen eines Thrombozyten (Bild links): 1. kanalikuläres System, 2. Microtubuli, 3.  $\alpha$ -Granulom, 4. dichtes Granulom „dense granule“, 5. Glykogen, 6. Mitochondrien und die dazugehörige elektronenoptische Aufnahme (Bild Mitte unten x 21000). Elektronenoptische Darstellung eines aktivierten Thrombozyten mit einem Microtubulusring um die zentral gelegene Granula und Ausbildung von Pseudopodien (Bild rechts unten x 30000).<sup>90</sup>

Die periphere Zone der Thrombozyten, bestehend aus der protein- und mucopolysaccharidreichen Glykokalix einer phospholipidreichen Zytoplasmamembran, sowie der so genannten submembranösen Region, bildet die Oberfläche der Thrombozyten. Eingelagert in die Zytoplasmamembran befinden sich Membranproteine. Die submembranöse Region ist über Filamente eng mit der Zytoplasmamembran verbunden und somit in der Lage, Signale von der Thrombozytenoberfläche über chemische und physikalische Veränderungen für das Zellinnere zu übersetzen.<sup>183</sup> Das thrombozytäre Zytoskelett lässt sich in drei Bereiche untergliedern: Das aus Spectrin gebildete und der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran anhaftende sogenannte Membranskelett.<sup>23,76,77</sup> In Thrombozyten konnten mehr als 2000 verschiedene Spectrin-

moleküle gezeigt werden.<sup>76,77,103</sup> Bisher ist relativ wenig darüber bekannt, wie die exakte Verbindung zwischen den Spectrinmolekülen und der Plasmamembran bzw. den Aktinmolekülen aussieht. Nahe der Plasmamembran im Zytoplasma befindet sich ein einzelner, zu einer Spule aufgewickelter Microtubulus<sup>133</sup>, dabei handelt es sich um ein aus  $\alpha\beta$ -Tubulindimeren bestehendes Polymer. Es sind vier verschiedene  $\beta$ -Tubuline ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ) in Thrombozyten bekannt.<sup>233</sup> Und als dritter Bereich das das gelartige Zytoplasma ausfüllende dreidimensionale Netzwerk aus Aktin, Myosin und Aktin-Bindungsproteinen. Aktin ist das am häufigsten in Thrombozyten vorkommende Protein.<sup>183</sup> Im ruhenden Zustand formen dabei ca. 800000 Moleküle 2000-5000 lineare Actinpolymere.<sup>76,103</sup> Die linearen Actin-Polymere werden unter Beteiligung von Filamin<sup>219,221</sup> und  $\alpha$ -Actinin<sup>220</sup> zu einem Netzwerk verbunden. Während der Thrombozytenaktivierung reorganisieren die Strukturproteine die Zellorganellen, zu denen sie eine Verbindung besitzen.<sup>104</sup>

Im Zytoplasma gelegen befindet sich in Gestalt von Mitochondrien und den drei verschiedenen Formen thrombozytärer Speichergranula die Zone der Organellen. Dabei handelt es sich um so genannte electron-dense-bodies, d.h. dichte Granula, Lysosomen und hauptsächlich  $\alpha$ -Granula mit einem Durchmesser von 300-500 nm. In ihnen werden Substanzen gespeichert, die die Funktionen der Thrombozyten wie Aggregation, Adhäsion, Chemotaxis und Inflammation unterstützen bzw. erst ermöglichen.<sup>86,117</sup> Diese werden in der Tabelle 2 ausführlich genannt. Die Membranen der  $\alpha$ -Granula beinhalten neben den Glykoproteinen vor allem P-Selektin (CD62p), p24 (CD9) und PECAM (CD31).<sup>106</sup> Im Lumen befinden sich Zytokine (RANTES, PDGF, PF4, etc.) und Gerinnungsfaktoren (FV, FVIII, FX und FXIII).<sup>217</sup> P-Selektin und einige Glykoproteine sind auch in den *dense granules* enthalten, die jedoch vorwiegend Nukleotide (ATP, ADP, GTP und GDP), Kalzium- und Magnesiumionen und Histamin enthalten.<sup>38</sup> Der hohe Serotoningehalt führt zur dunklen Färbung der *dense granules* bei elektronenmikroskopischer Betrachtung.<sup>20</sup>

**Tabelle 2.** Für die Funktion der Thrombozyten entscheidende Inhaltsstoffe ihrer sekretorischen Granula ( $\alpha$ -Granula, dense granules und Lysosomen). <sup>242,190,191,12,117,234,101,52,31,80,81,82,116,173,49,67,47,15,169</sup>

Kompartiment	Membranfaktoren	lösliche Faktoren
<b><math>\alpha</math>-Granula</b>	P-Selektin (CD62p)	Fibrinogen, vWF
	GPIIb/IX (CD42), GPIIb/IIIa (CD41/CD61), GPIV (CD36)	PDGF, TGF $\beta$ , ECGF, EGF, VEGF,
	p24 (CD9)	IL-1 $\beta$ , PF4, RANTES
	PECAM (CD31)	PAI1, TFPI, C1-
	GLUT-3	Inhibitor
	Vitronectin Rezeptor	Multimerin, GPIa
	Osteonectin	CTAP-III, NAP-2
<b>dense granules (elektronendichte Granula)</b>	Ral1	Faktor V, VIII, XI, X,III
	GPIIb, GPIIb/IIIa (CD61)	ATP, ADP, GTP, GDP
	LIMP1 (CD63)	Serotonin (5-HT)
	LAMP2	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
	P-Selektin (CD62p)	Pyrophosphat
<b>Lysosomen</b>		Histamin
	LIMP1 (CD63)	Cathepsine D u. E
	LAMP1	Carboxylasen A u. B
	LAMP2	Collagenase
		Saure Phosphatase
		Heparinase
		versch.Glykosylasen

Die *lysosomal associated membrane proteins* (LAMP) sind charakteristische Bestandteile der Lysosomenmembran. Zu diesen glykosylierten Proteinen gehört LIMP1 (CD63), LAMP-1 und LAMP-2.<sup>174</sup> Darüber hinaus sind zahlreiche Glykosylasen und andere katabole Enzyme (Heparinase, Collagenase, etc.) enthalten. Eine Reihe von den in der thrombozytären Speichergranula enthaltenden Proteinen, so z.B. Fibrinogen und Fibronectin, werden aus dem Plasma aufgenommen und nicht von den Megakaryozyten selbst gebildet<sup>135</sup>, wobei die

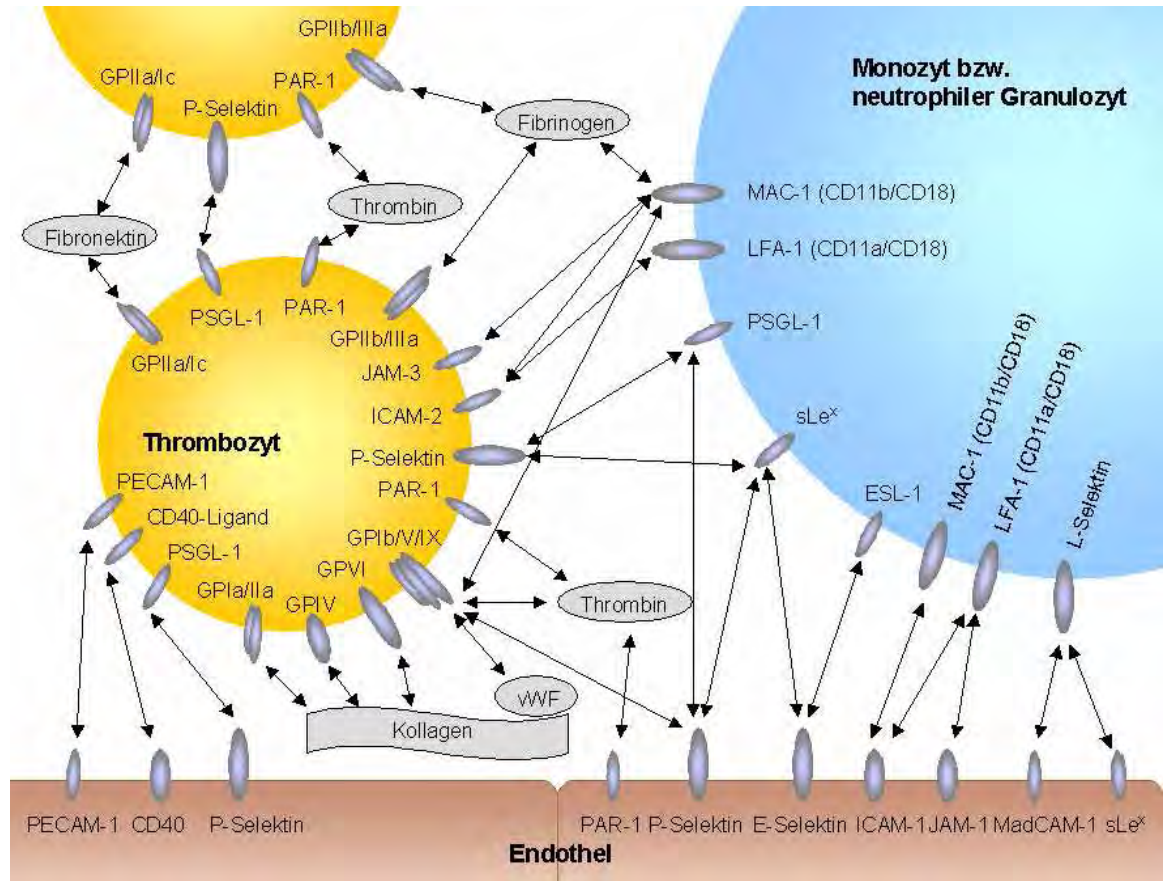
Endozytose unter Beteiligung des OCS und Clathrin-haltiger Vesikel stattfindet.<sup>135,275</sup> Ein weiteres Beispiel ist der *tissue factor*, für ihn konnte bislang weder in Megakaryozyten noch in Thrombozyten eine mRNA nachgewiesen werden; somit ist eine Synthese unwahrscheinlich. Man geht auch hier davon aus, dass der auf Monozyten exprimierte *tissue factor* über das OCS in Thrombozyten gelangt.<sup>212</sup>

Ein weiterer morphologischer Bereich ist das bereits genannte Membransystem. Dieses setzt sich aus dem offenen kanalikulären System (*surface connected, open canalicular system* = OCS) und dem dichten tubulären System (*dense tubular system* = DTS) zusammen. Das OCS besteht aus gewundenen Invaginationen der Zellwand - wie oben bereits beschrieben - die weit in das Innere des Thrombozyten reichen und miteinander in Verbindung stehen. Die Aufnahme von Stoffen aus der Umgebung erfolgt semiselektiv nach Molekülgröße, so wird gewährleistet, dass z.B. größere Moleküle wie Antikörper nicht in die Thrombozyten eintreten können. Unbekannt ist bisher, in wie weit die Lipidmembran des OCS bzw. deren Gehalt an Glykoproteinen mit denen der Thrombozytenoberfläche übereinstimmt. Das dichte tubuläre System ist ein Residium des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Es enthält hohe Konzentrationen an freien Calcium-Ionen, welche bei Bedarf in das Zytoplasma sezerniert werden können und zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen.<sup>275</sup> Die Exozytose stellt den wesentlichen Mechanismus der Degranulierung, d.h. der Freisetzung von Faktoren aus den Speichergranula nach Aktivierung der Thrombozyten dar.<sup>150</sup> Da aktivierte Thrombozyten eine relativ große Oberfläche besitzen, erfolgt die Abgabe der gespeicherten Mediatoren in das Gefäßsystem bzw. in den Extrazellularraum relativ schnell.

### 1.1.3 Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche

Die Oberfläche der Thrombozyten weist ein breites Spektrum unterschiedlicher Rezeptormoleküle auf. Diese ermöglichen die für die Thrombozytenfunktion sowohl im Rahmen der hämostatischen Prozesse, als auch bei der Vermittlung von proinflammatorischen Funktionen notwendigen Interaktionen mit dem Endothel, den vaskulären Zellen, den Strukturen der Gefäßwand und den

plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Ihre vielfältigen Wechselwirkungen mit plasmatischen Faktoren und Rezeptoren von Entzündungs- aber auch Endothelzellen sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4:** Rezeptoren der Thrombozyten und deren Wechselwirkung mit plasmatischen Faktoren (Kollagen, vWF, Thrombin, Fibrinogen, Fibronektin) und Rezeptorliganden der Monozyten, neutrophilen Granulozyten bzw. Endothelzellen.<sup>33</sup> Der GPIIa/IIa-Komplex, GPIV und GPVI bindet an subendotheliales Kollagen bei gleichzeitiger Bindung des GPIb/IX/V-Komplexes an vWF. Weitere Wechselwirkungen sind die Bindung des GPIIb/IIIa-Komplexes an Fibrinogen und des GPIIa/Ic-Komplexes an Fibronektin. Im Thrombus stellen diese Interaktionen und die Bindung der PAR-1 (*proteinase activated receptor*) Moleküle an Thrombin die wichtigsten Quervernetzungen der Thrombozyten untereinander und mit dem Fibringerinnsel dar. Neben den GP-Komplexen finden sich zahlreiche Membranproteine, die im Zusammenhang mit der Zell-Zelladhäsion stehen. Hierzu zählen vor allem P-Selektin, PSGL-1 (P-Selektin Glykoproteinligand-1), CD40-Ligand, JAM-3, PECAM-1 und ICAM-2, die über direkte Wechselwirkungen mit Integrinen und Rezeptorliganden den Kontakt zu Leukozyten oder Endothelzellen herstellen können.<sup>105,111,229,258</sup> Indirekte Verbindungen entstehen z.B. durch die Interaktion von MAC-1 (CD11b/CD18) mit Fibrinogen, das wiederum über GPIIb/IIIa an aktivierte Thrombozyten bindet.<sup>99</sup> Die Assoziation von Thrombin an PAR-1 trägt zur Quervernetzung bei, da PAR-1 auch von Endothelzellen exprimiert wird.<sup>51,4,33</sup>

Man kann diese Rezeptoren anhand ihrer Molekülstrukturen in vier Gruppen unterteilen: Integrine (z.B. Fibrinogenrezeptor Integrin  $\alpha 2 \beta 3$ ) und leucinreiche

Glykoproteine (z.B. Kollagen/vWF-Rezeptor GPIb/IX/V) gehören beide zur Familie der Membranglykoproteine, sowie Selektine (z.B. P-Selektin) und Rezeptoren vom Immunglobulintyp (z.B. PECAM-1).

## 1.2 Aufgabe und Wirkung von Thrombozyten

Die Thrombozyten spielen zunächst eine wichtige Rolle beim Wundverschluss nach einer Gefäßverletzung. Sie sind aber auch maßgeblich an der im Anschluß daran stattfindenden Wundheilung beteiligt. Unmittelbar nach Gewebs- bzw. Gefäßverletzung werden die Prozesse der primären und sekundären Hämostase und die der akuten Inflammation in Gang gesetzt. Ziel der Hämostase ist der schnelle Gefäßverschluß, um einen massiven Blutverlust zu vermeiden.<sup>261</sup> Durch die inflammatorische Reaktion erfolgt eine Aktivierung von Abwehrmechanismen, damit das Eindringen möglicher Keime verhindert wird.

### 1.2.1 Die initiale Funktion der Thrombozyten bei der akuten Gefäßverletzung „primäre Hämostase“ = Adhäsion-Aktivierung-Aggregation

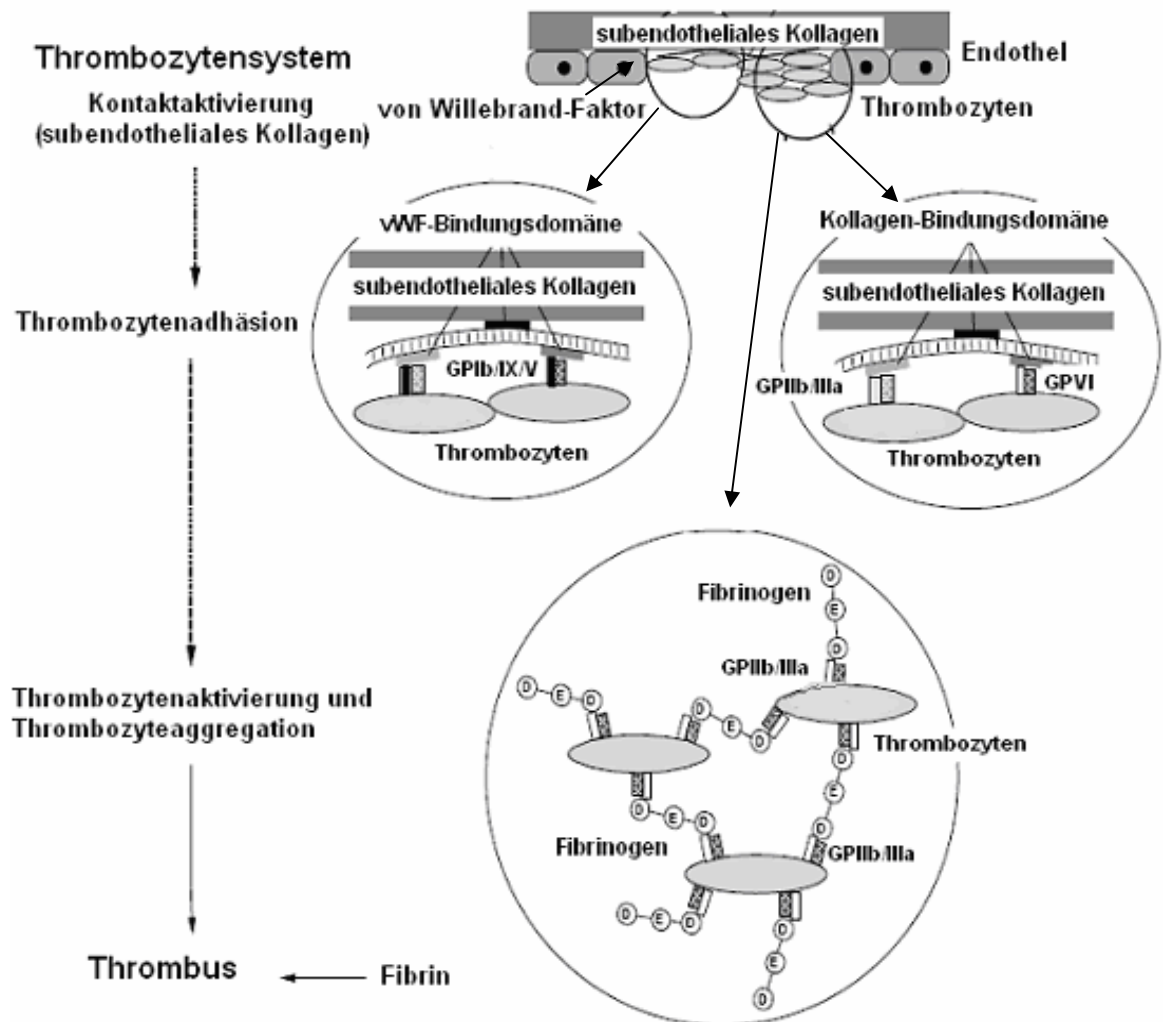
Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Blut, ohne mit Strukturen der Gefäßwand oder anderen Blutzellen in Kontakt zu treten. Infolge einer Schädigung des Gefäßendothels laufen nachfolgend beschriebene Prozesse ab:

Beim gesunden Individuum liegt die Blutungszeit, d.h. die Zeit, in der eine Blutung nach Verletzung von kleinen Gefäßen zum Stillstand kommt, zwischen 1 bis zu 3 Minuten. Diese primäre Hämostase kommt vornehmlich durch die Vasokonstriktion und den mechanischen Verschluss durch einen Thrombozytenpfropf, auch Thrombus genannt, zustande.<sup>27,157,225,266,285</sup>

Bei einem Endothelschaden der Gefäßwand und der nun offenliegenden thrombogenen subendothelialen Matrix kommt es im Rahmen der Hämostase zur Adhäsion ruhender, im Blut zirkulierender Thrombozyten an nun freiliegendes Kollagen<sup>10</sup> (primäre Adhäsion). Dieser initiale Adhäsionsvorgang wird



durch thrombozytäre Membranglykoprotein-Rezeptoren, die Integrine, gesteuert und resultiert in Formveränderung, Thrombozytenaktivierung und Freisetzung der Inhaltsstoffe aus der Speichergranula.<sup>10</sup>



**Abb. 5:** Adhäsion der Thrombozyten an das verletzte Endothel: Aktivierte Endothelzellen exprimieren kollagenimmobilisierten vWF (von-Willebrand-Faktor). Der Oberflächenrezeptor GP/IX/V der Thrombozyten bindet an den endothelialen vW. Die feste Adhäsion erfolgt über die zwei Kollagenrezeptoren GPIa/IIa und GPVI durch Bindung an freiliegendes Kollagen. Die Verbindungen zwischen den Thrombozyten werden hauptsächlich durch Fibrinogen-Moleküle gebildet, die an die GPIIb/IIIa - Rezeptoren der Thrombozyten binden.<sup>292</sup>

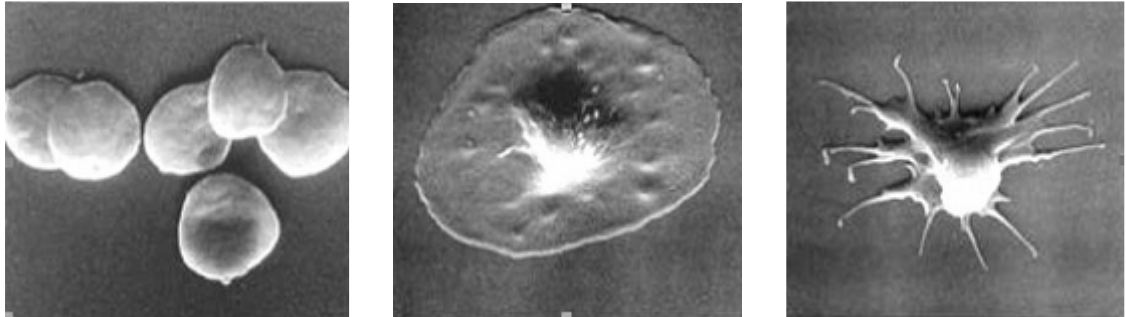
Die Plättchenadhäsion, die unter arteriellen Strömungsbedingungen (Arterien, Arteriolen) und somit unter hohen Scherkräften stattfindet, wird über den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt.<sup>2</sup> Dieser wird zum Teil von Endothelzellen und Megakaryozyten<sup>3</sup> sezerniert, aber auch aus thrombozytären Speichergranula freigesetzt und an die freiliegenden Kollagenfasern des Subendothels ge-



bunden. Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors für vWF (Glykoprotein Ib-IX-V) mit kollagenimmobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der Zellwandläsion hergestellt.<sup>2,225,226,227,231,266</sup> Diese Interaktion bedingt keine feste Bindung der Thrombozyten an die Matrix, so dass - durch die Scherkräfte des strömenden Blutes bedingt - ein „rolling“ der Thrombozyten auf dem vWF beobachtet werden kann.<sup>231</sup> Zwei weitere thrombozytäre Glykoproteine (GPIa/IIa = Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI, Kollagenrezeptoren) interagieren zugleich direkt mit dem freiliegenden Kollagen und stabilisieren die Bindung.<sup>246,264,227,265</sup> Diese Bindung kann auch bei ruhigem Blutfluss stattfinden. Im Gegensatz zur Bindung über den vWF ermöglicht die direkte Bindung über Kollagen eine stabile Adhäsion und das Wachstum des Thrombus.<sup>123</sup> So ermöglicht GPVI als der wichtigste Kollagenrezeptor<sup>132</sup> nicht nur eine festere Bindung direkt an Kollagen, sondern vermittelt auch die Aktivierung anderer, zur Adhäsion notwendiger Rezeptoren, wie Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , welches Fibrinogen und Fibronectin an die Matrix bindet und  $\alpha_2\beta_1$ , welches eine festere Bindung durch Bindung an Kollagen vermittelt.<sup>188,189,41,230</sup> Unter Beteiligung der bereits genannten Rezeptoren für Kollagen (GPIa/IIa und GPVI) aber auch Fibrinogen (GPIIb/IIIa) und Fibronectin (GPIIa/Ic) entsteht somit eine feste Bindung der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix. Die nun folgende Aggregation der durch die Adhäsion aktivierten Thrombozyten entsteht hauptsächlich durch die Interaktion zwischen dem GPIIb/IIIa-Komplex und Fibrinogen.<sup>246</sup> Weitere Wechselwirkungen stabilisieren die Bindung der Thrombozyten untereinander und die Bindung an das Fibringerinnsel, siehe Abb. 5.

Die Adhäsion der Thrombozyten an der subendothelialen Matrix fördert eine Vielzahl von Prozessen, welche dieselben von einem ruhenden in den aktivierten Zustand überführen. Ausgehend von der Ligandenbindung an die unterschiedlichen Rezeptoren, wie z.B. Fibrinogen an GPIIb/IIIa, Kollagen an GPVI oder Thrombin an PAR-1<sup>278,10</sup> werden G-Proteine<sup>25,24</sup> aktiviert, die dieses Signal meist an die Proteinkinase C (PKC) weiterleiten. Der gleichzeitig induzierte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zu umfassenden Veränderungen des Zytoskeletts der Thrombozyten. Diese bewirken eine Zunahme der Thrombozytenoberfläche durch Ausbildung von Filopodien und Zellspreizung durch Ausspannen von Lamellen<sup>104</sup>, siehe Abb. 6. Bei der mit der Aktivierung der Thrombozyten einhergehenden Degranulation findet eine Frei-

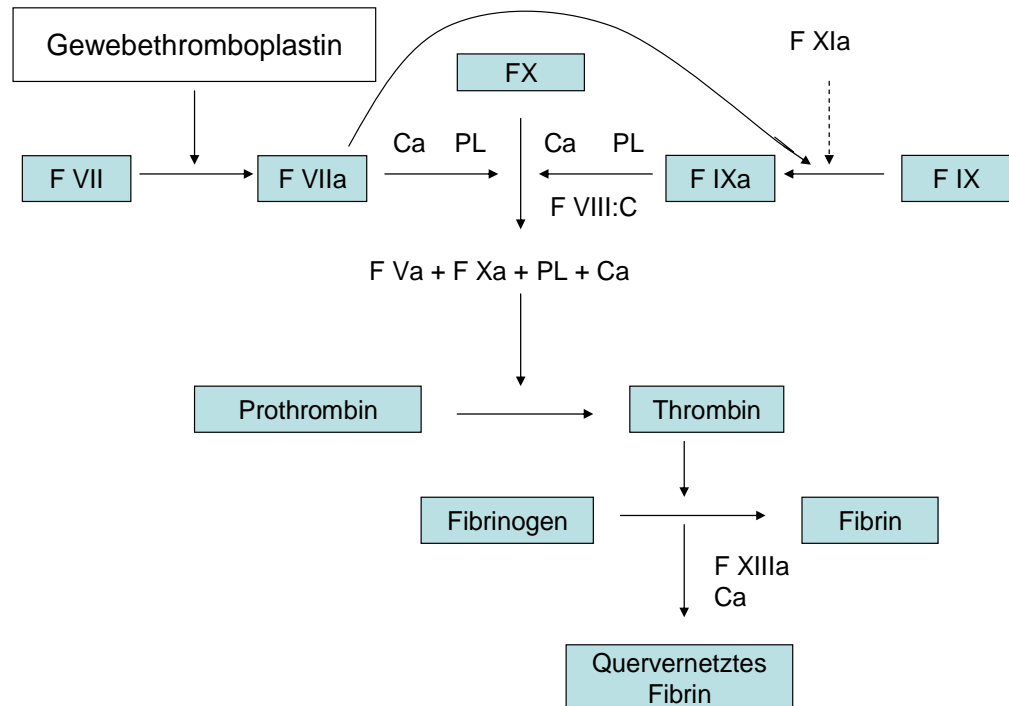
setzung löslicher Faktoren aus den Granula statt. Zudem werden membrangebundene Proteinrezeptoren auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen präsentiert.



**Abb. 6:** Änderung des Zytoskeletts und damit der Plättchenmorphologie durch Aktivierung. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen ruhenden Thrombozyten mit diskoider Form (Bild 1, links, x 3000), einen flach ausgespreizten Thrombozyten nach dem Calciumeinstrom in das Zytoplasma (Bild 2, Mitte, x 3000) und die Ausbildung von Filopodien (Bild 3, rechts x 3000).<sup>292</sup>

### 1.2.2 Die „sekundäre Hämostase“ – Interaktionen der Thrombozyten im Rahmen der Gerinnungskaskade

Die sich der primären Hämostase anschließende Phase der sekundären Hämostase beinhaltet die Initiierung der Gerinnungskaskade bis zur Formation des Fibringerinnsels. Da das primäre Plättchenaggregat relativ instabil ist, erfordert eine effektive und dauerhafte Blutstillung die Konsolidierung des Primärthrombus. Dabei spielt als initiierender Mechanismus der Gerinnung *in vivo* die Aktivierung von Faktor VII, wie in Abbildung 8 dargestellt, offensichtlich die entscheidende Rolle.<sup>161,225</sup> Im Gegensatz zu der in Abb. 7 dargestellten Gerinnungskaskade kommt es bei der Aktivierung des intrinsischen Systems zur Adsorption von Faktor XII an negativ geladene Oberflächen. Es folgt eine Aktivierung der Faktoren XI und IX unter Einbindung von Präkallikrein und Hochmolekulargewichtskininogen.<sup>180</sup> Bei dem auch als Gewebethromboplastin oder Factor III bezeichneten *tissue factor* handelt es sich um einen Protein-Phospholipid-Komplex.<sup>180</sup>



**Abb. 7:** Plasmatishes Gerinnungssystem – vereinfachte Darstellung, schematisch. (F = Gerinnungsfaktor, PL = Phospholipid, Ca = Kalziumionen)<sup>180</sup> Die Aktivierung von Faktor VII erfolgt durch Gewebethromboplastin, welches bei einer Gewebeverletzung aus beschädigten Endothelzellen bzw. beschädigten Blutzellen freigesetzt wird. Der aktivierte Faktor VII (FVIIa) aktiviert nun Faktor X (FXa). Daneben ist Faktor VIIa über die sogenannte Jasso-Schleife in der Lage, den Faktor IX zu aktivieren (FIXa). Dieser aktiviert in Anwesenheit von Phospholipid und Kalziumionen (Ca) Faktor X (FXa). Faktor VIII:C katalysiert diese Reaktion. Faktor X und VIII besitzen keine eigene enzymatische Aktivität und müssen erst durch Thrombin aktiviert werden (positive Rückkopplung). FXa initiiert in Verbindung mit Faktor V, als Kofaktor, sowie Phospholipiden und Kalziumionen die Bildung von Thrombin aus Prothrombin. Thrombin spaltet Fibrinogen und in Anwesenheit von FXIIIa und Kalziumionen entsteht polymerisiertes Fibrin.

Er wird zum einen von Körperzellen exprimiert, die in keiner direkten Verbindung mit dem Blutkreislauf stehen und zum anderen ist er als lösliche, nur geringfügig aktive Form und als Mikrovesikel-gebundene Form innerhalb des Blutkreislaufes zu finden. Ebenso sind Monozyten in der Lage, innerhalb weniger Minuten nach Stimulation – z.B. mit Kollagen oder bakteriellem LPS – *tissue factor* zu synthetisieren. Es wird vermutet, dass der in Thrombozyten nachgewiesene *tissue factor* durch Mikrovesikeltrafer aus Monozyten übertragen wurde.<sup>94</sup> Nach einer Gefäßschädigung werden die Thrombozyten aktiviert und aggregieren. Der gespeicherte *tissue factor* gelangt so an die Oberfläche und unterstützt die Gerinnungskaskade. Die aktivierten Thrombozyten binden via P-Selektin/PSGL-1 Interaktion an neutrophile Granulozyten bzw. auch an

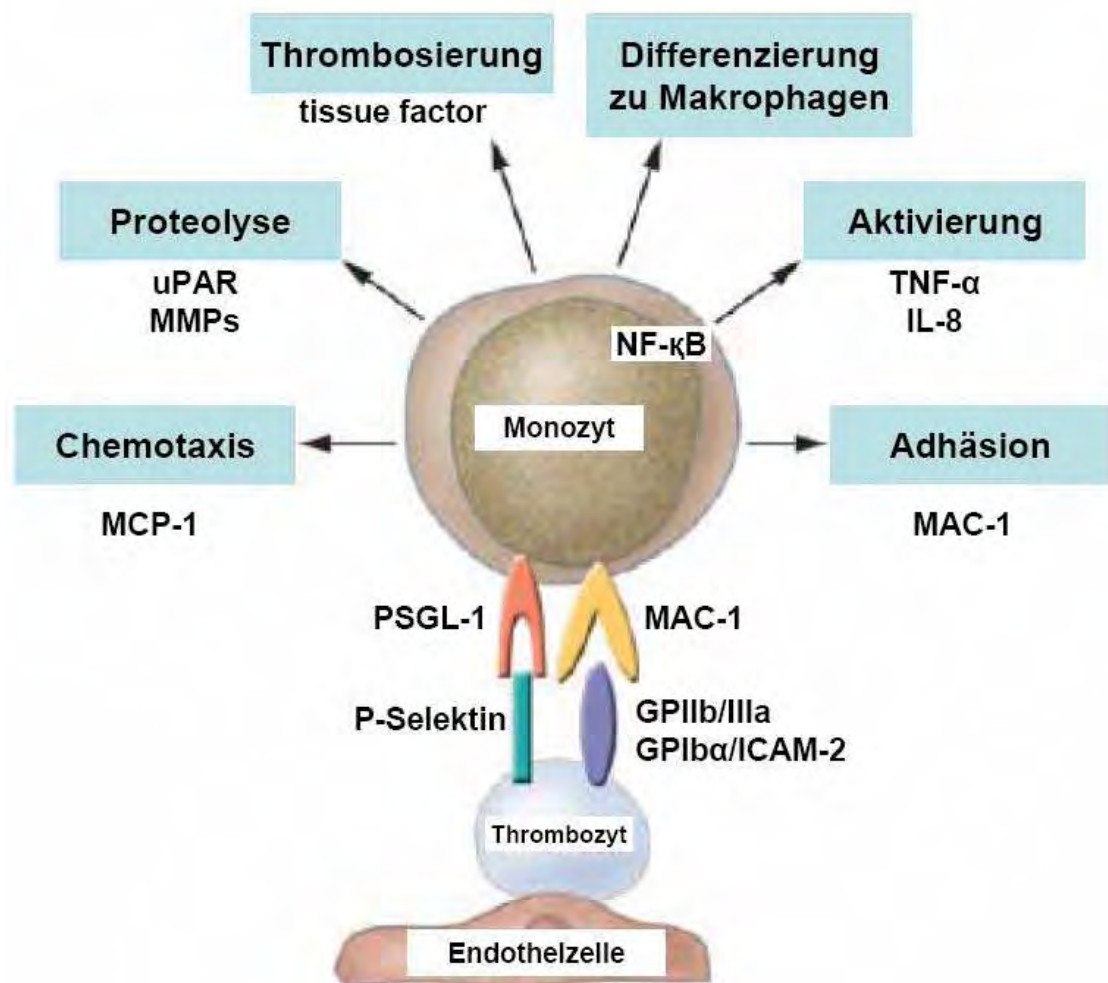
Monozyten, welche ihrerseits Mikrovesikel-gebundenen *tissue factor* freisetzen. Die Sekretion von Proteasen aus Granulozyten und Monozyten könnte dazu beitragen, dass der ebenfalls von aktivierten Thrombozyten ausgeschiedene *tissue factor pathway inhibitor* durch proteolytische Spaltung inaktiviert wird. Über diesen Mechanismus könnte der Thrombozyten-, Mikrovesikel- und Monozyten-assoziierte *tissue factor* seine Wirkung auf die intravasale Initiierung der Gerinnungskaskade ausüben.

### 1.2.3 Der Einfluss der Thrombozyten auf Prozesse im Rahmen der akuten Inflammation

Wie bereits einleitend erwähnt, besitzen Thrombozyten vielfältige, über Blutstillung und Blutgerinnung hinausreichende Funktionen. So ist die akute Phase der Inflammation Bestandteil des ersten Abschnitts der Wundheilung. Thrombozyten werden durch eine große Anzahl endogener und exogener proinflammatorischer Stimulantien – wie Antigene, Antigen-Antikörperkomplexe, Faktoren des Komplementsystems, Bakterien und deren Endotoxine, sowie Viren – aktiviert.<sup>271,156</sup> Sie besitzen die Fähigkeit, „Fremdkörper“ zu phagozytieren, setzen nach Aktivierung proinflammatorische Enzyme frei, so z.B. Elastasen und Kollagenasen aus den Lysosomen, die zum Gewebsuntergang führen, und wirken chemotaktisch bzw. interagieren mit Entzündungszellen. Dies bedeutet, dass Thrombozyten sowohl als Effektor-, als auch als Zielzellen des Entzündungsgeschehens vieler Erkrankungen fungieren.<sup>89,112,137,162,199</sup> Zu den bei der Degranulation freigesetzten thrombozytären Faktoren gehören zum einen solche, die direkten Einfluss auf Endothelzellen oder glatte Muskelzellen ausüben, z.B. Serotonin<sup>110,159</sup>, Histamin<sup>159</sup> und ADP und solche, die ihre Wirkung erst durch Rekrutierung und Aktivierung anderer Zellen entfalten, dazu gehören unter anderem Chemokine und Wachstumsfaktoren, z.B. PF-4<sup>53</sup>, PDGF, TGF- $\beta$ <sup>1,261</sup>, RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ . Um nur einige Beispiele zu nennen: Histamin und Serotonin<sup>108</sup> erhöhen die vaskuläre Permeabilität. Histamin fördert darüber hinaus die Peroxidproduktion in Makrophagen, erhöht die Aktivität natürlicher Killerzellen und induziert sowohl die Kontraktion von Endothelzellen, zur Öffnung der Zell-zu-Zell-Verbindungen, als auch ihre Relaxation, wodurch es teil-

weise wieder zum Verschluss der Zell-zu-Zell-Verbindungen kommt. Histamin besitzt somit sowohl pro- als auch anti-inflammatorisches Potential.<sup>159,162</sup> Der *platelet derived growth factor* (PDGF) wirkt chemotaktisch sowohl auf Monozyten als auch auf Fibroblasten und stimuliert das Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen.<sup>162</sup> Eine ähnliche Wirkung zeigen auch VEGF, EGF, TGF- $\beta$ <sup>1,261</sup> und FGF. RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*) wirken chemotaktisch auf Eosinophile, Basophile und Monozyten.<sup>129</sup> Im Zusammenspiel der thrombozytären Zytokine und Wachstumsfaktoren wird der gesamte Prozess der Geweberegeneration von der Inflammation bis hin zur Strukturierung der extrazellulären Matrix unterstützt und gesteuert.<sup>61,98,160,241</sup> Eine besondere Rolle im Rahmen von Inflammationen spielen auch die Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten.<sup>144,269</sup> Dabei wurde sowohl die Interaktion zwischen Leukozyten mit an der Gefäßwand immobilisierten Thrombozyten<sup>144</sup>, als auch die Bildung von frei zirkulierenden Thrombozyten-Neutrophilen - bzw. Thrombozyten-Monozyten - Komplexen beobachtet.<sup>84,204</sup> Nach der Adhäsion der Thrombozyten am Endothel und der folgenden Aktivierung werden Substanzen freigesetzt, die die Chemotaxis und Migration der Leukozyten, vor allem der Monozyten, aus der Zirkulation an die Plättchenaggregate bedingen. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess mit Selektin-vermitteltem Rollen am Endothel, der Aktivierung der Zellen und schließlich der Integrin-vermittelten Adhäsion und der Einwanderung in die Gefäßintima.<sup>87,245</sup> Durch die Bindung des P-Selektins der Thrombozyten an den passenden Ligand auf Leukozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten), dem PSGL-1, wird das Rollen entlang des Endothels über eine lockere Bindung der beiden Zelltypen vermittelt.<sup>70,282</sup> Die nun folgende Aktivierung führt auf der Oberfläche der Leukozyten zu einer vermehrten Integrinpräsentation (MAC-1, macrophage antigen-1). Zur festen Bindung an die Thrombozyten bindet MAC-1 sowohl an ICAM-2 der Thrombozyten als auch an das GPIIb und an GPIIb/IIIa assoziiertes Fibrinogen.<sup>240</sup> Thrombozyten können über P-Selektin eine Sezernierung von IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$  und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aus Monozyten induzieren, wie in Abb. 8 dargestellt.<sup>17,185</sup> Hierdurch sorgen sie für die vermehrte Rekrutierung zirkulierender Leukozyten aus dem Blutfluss. Des Weiteren fördert die PSGL-1-P-Selektin-Verknüpfung die translationell regulierte Expression des Oberflächenproteasenrezeptors uPAR (urokinase-type

plasminogen activator receptor), der wesentlich für die Regulation der Integrin-assoziierten Leukozytenadhäsion ist.<sup>167,168</sup>



**Abb. 8:** Am Endothel adhärenente Thrombozyten rekrutieren und aktivieren Monozyten: Aktivierte Plättchen interagieren dazu mit dem monozytären PSGL-1 über P-Selektin und dem monozytären MAC-1 über GPIIb/IIIa oder GPIbα. Thrombozyten fördern die monozytäre Sekretion von Chemokinen, Zytokinen, prokoagulatorischen Faktoren für die Thrombosierung, die Aufregulation und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Proteasen und induzieren die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen.<sup>88</sup>

Die beschriebenen Prozesse verdeutlichen die nicht unerhebliche Beteiligung von Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen. So ist bei den meisten Entzündungsgeschehen von einer sekundären Aktivierung der Thrombozyten auszugehen, während vornehmlich bei allergischen Reaktionen eine primäre Aktivierung der antigen-sensibilisierten Thrombozyten zu einem sekundären Entzündungsgeschehen führt.<sup>138</sup>

### 1.2.3.1 Thrombozytäre Faktoren und ihre Leistungen im Bereich der Immunabwehr

Ein weiteres Indiz für die nicht unerhebliche Rolle der Thrombozyten im Rahmen der akuten Inflammation ist die Freisetzung thrombozytärer Faktoren mit antimikrobieller Wirkung für die unspezifische Abwehrreaktion. Die Entzündungsreaktion ist hauptsächlich auf die spezifische und unspezifische Bekämpfung eindringender Keime ausgerichtet.<sup>139</sup>

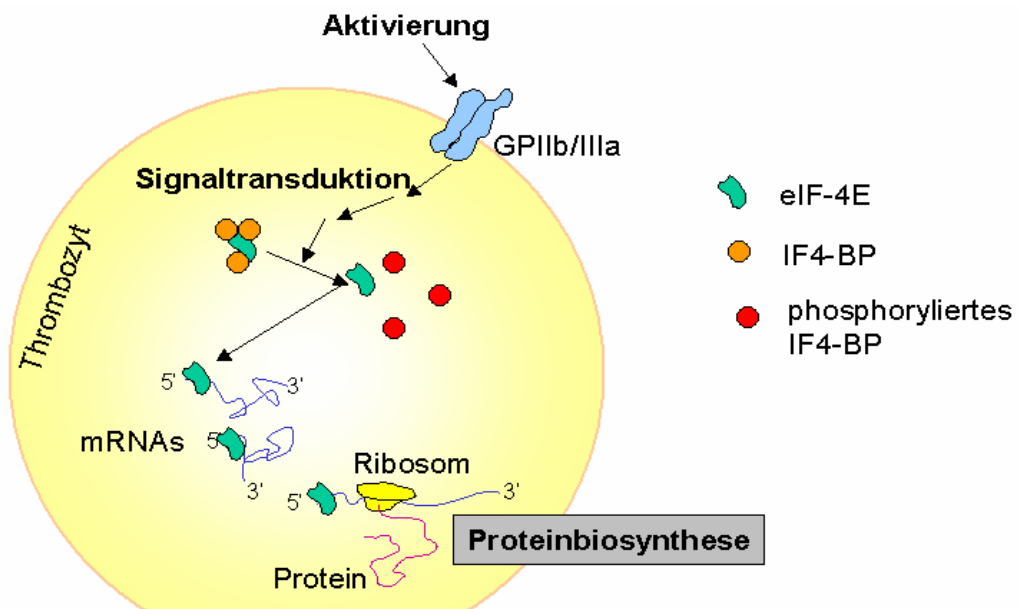
Die Ausschüttung der in der  $\alpha$ -Granula lokalisierten antimikrobiell wirksamen thrombozytären Faktoren kann durch die Mikroorganismen selbst oder durch deren Toxine z.B. durch *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* und *Salmonellen*<sup>283</sup> hervorgerufen werden. So zeigen zytotoxische freie Radikale,  $\beta$ -Lysin und Thrombozidine (TCs = *thrombocidins*) vorwiegend bakterizide Eigenschaften gegen *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*<sup>283</sup>, *Escherichia coli* und andere.<sup>139,283</sup> *In vitro* konnten ebenfalls bakteriostatische bzw. bakterizide Eigenschaften gegen *Staphylococcus*, *Listeria* und *Salmonellen* nachgewiesen werden.<sup>283</sup> Bei einigen *Cryptococcus*-Stämmen konnten auch fungizide Wirkungen der TCs nachgewiesen werden.<sup>283</sup> Des Weiteren konnte auch die Abwehr parasitärer Mikroorganismen, wie z.B. *Schistosoma mansonii*<sup>22</sup>, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, sowie *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* und die Inkorporation von Viren, so z.B. Influenza, Herpes, HIV oder HCV, in Thrombozyten gezeigt werden. Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob dieser Mechanismus einen protektiven Effekt besitzt.<sup>283</sup>

### 1.2.4 „Nachhaltige Wirkungen“ der aktivierten Thrombozyten

Die bereits beschriebenen Vorgänge der Aggregation und Degranulation bilden die Grundlage der hämostatischen und inflammatorischen Wirkung von Thrombozyten. Sie sind jedoch meist innerhalb von einigen Minuten abgeschlossen. Fraglich ist somit, ob nachhaltige Wirkungen von Thrombozyten im Rahmen der Wundheilung, aber auch bei inflammatorischen Prozessen, im Gefäßsystem nachgewiesen werden können. Basis für die nachhaltigen chemotaktischen

und inflammatorischen Wirkungen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren ist ihre in den inflammatorischen Effektorzellen stattfindende Neusynthese. In Monozyten wird nach Kontakt mit aktivierten Thrombozyten die Expression der Gene von IL-1 $\beta$ , IL-8 und MCP-1 beobachtet.<sup>185</sup>

Bis vor kurzem hielt man die Möglichkeit einer in den kernlosen Thrombozyten stattfindenden *de novo* Proteinsynthese für unwahrscheinlich. In unterschiedlichen Studien konnte aber nachgewiesen werden, dass Blutplättchen trotz des fehlenden Zellkerns über das zur Proteinsynthese notwendige Instrumentarium verfügen und die Biosynthese offensichtlich auf der Basis der vorhandenen Gentranskripte stattfindet.<sup>134,228,270</sup> Mittels verschiedener Methoden wie Northernblot, cDNA-Klonierung oder auch RT-PCR konnte die mRNA zahlreicher thrombozytenspezifischer Gene, insbesondere für GPIIb, GPIIIa, Chemokine und Rezeptoren identifiziert werden.<sup>7,34,95,209,228,277</sup> Ebenso konnte die Anwesenheit von Ribosomen als weiterem essentiellen funktionellen Bestandteil der Proteinsynthese nachgewiesen werden.<sup>254</sup> Des Weiteren gelang es auch, den Signaltransduktionsweg für die Regulation der *de novo* Proteinsynthese von IL-1 $\beta$  in Thrombozyten nach Aktivierung derselben darzustellen (Abb. 9).<sup>109,154</sup>



**Abb. 9:** Modell der *de novo* Proteinbiosynthese in aktivierten Thrombozyten.<sup>33</sup> Nach Aktivierung der Thrombozyten unter Beteiligung des GPIIb/IIIa-Komplexes wird eine MAPK-abhängige Signalkaskade ausgelöst, die zunächst die Kinase p70<sup>S6K</sup> und schließlich die Translationsfaktoren eIF-4E und eIF-2 $\alpha$  aktiviert. Der aktivierte eIF-4E ist dann in der Lage, an die 5'-Cap-Strukturen von mRNA-Molekülen zu binden und die ribosomale Translation zu starten.<sup>155,198,222</sup>



Diese am Beispiel von IL-1 $\beta$  gezeigte Regulation der *de novo* Proteinsynthese in Thrombozyten könnte auch auf andere Proteine zutreffen, deren Synthese in Plättchen gezeigt wurde.<sup>20,21,26,30,49,228,270</sup>

### 1.3 Struktur, Synthese und Funktion von pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ und VEGF

Sowohl IL-1 $\beta$  als auch VEGF sind Zytokine, die in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten zu finden sind und bei Aktivierung freigesetzt werden.

Derzeit existieren zehn bekannte Mitglieder der Interleukin-1-Familie, jedoch sind nur vier von ihnen: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-1Ra (*interleukin-1 receptor antagonist*) untersucht. Während bei den anderen sechs keine genauen Angaben über ihre Funktionen existieren.<sup>57</sup> Bei IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18 handelt es sich um Agonisten die sich strukturell wenig unterscheiden, während es sich bei IL-1Ra um einen spezifischen Rezeptor-Antagonisten von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  handelt.<sup>57</sup>

IL-1 wurde in den 1940ern erstmals als hitzelabiles Protein beschrieben, das man in granulozytärem Exsudat gefunden hatte und das, wenn es Tieren injiziert wurde, Fieber auslöste. Damals wurde es als endogenes Pyrogen bezeichnet.<sup>5</sup> In späteren Studien konnte aber gezeigt werden, dass das endogene Pyrogen weit mehr Wirkungen hatte, als Fieber auszulösen. So konnten Rosenwasser et al.<sup>223</sup> demonstrieren, dass homogenes, gereinigtes, endogenes Pyrogen die T-Zell Antwort auf Mitogene steigert. Die Fähigkeit des von Makrophagen produzierten endogenen Pyrogens, auf Lymphozyten aktivierend zu wirken, ist für den heutigen Namen Interleukin verantwortlich. Verschiedene Substanzen, die ursprünglich nach ihren biologischen Wirkungen benannt wurden, wie *leucocytic endogenous mediator*, *mononuclear cell factor*, *catabolin*, *osteoclast activating factor*, *hemopoietin-1*, *lymphocyte proliferation promoting factor of neutrophils*, *melanoma growth inhibition factor* oder *tumor inhibitory factor-2* konnten später als IL-1 identifiziert werden.<sup>54</sup>

Bei **pro IL-1 $\beta$**  handelt es sich um einen Vorläufer von IL-1 $\beta$ .<sup>55</sup> Das Protein besitzt eine Molmasse von 31 kDA. Die Produktion von pro IL-1 $\beta$  wird durch die Anwesenheit von Mikroorganismen bzw. deren Produkten, aber auch durch eine Vielzahl anderer proinflammatorischer Prozesse stimuliert. Pro IL-1 $\beta$  be-

sitzt keine IL-1 $\beta$ -Bioaktivität und wird fast ausschließlich erst nach Überführung in seine aktive Form aus dem Zytosol der Zelle sezerniert.<sup>55,58</sup> Es wird hauptsächlich mittels eines IL-1 $\beta$  converting enzyme (*ILE*), auch als Caspase-1 bezeichnet<sup>55,58</sup>, in die mature Form umgewandelt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass weitere Enzyme wie Elastase, Chymotrypsin, einige Metalloproteasen etc. in der Lage sind, pro IL-1 $\beta$  in seine mature Form umzuwandeln.<sup>57</sup> Von Perregeaux konnte gezeigt werden, dass ein rapider intrazellulärer Kaliumabfall, wie es durch Einwirkung von ATP auf Zellen der Fall ist, zur Freisetzungsreaktion von maturem **IL-1 $\beta$**  führt.<sup>201,202,203</sup> Die Vermutung, dass es sich um eine rezeptorvermittelte Freisetzung von IL-1 $\beta$  handelt, konnte einige Zeit später erbracht werden. Auf Monozyten und Macrophagen wurde ein für ATP spezifischer Purinrezeptor P2X-7 nachgewiesen. Eine Stimulation dieser Zellen mit ATP in Anwesenheit von LPS führte zur Freisetzung von IL-1 $\beta$ , blockierte man diesen Rezeptor mittels eines monoklonalen Antikörpers, unterblieb die Sezernation von IL-1 $\beta$ .<sup>32,74</sup> *In vivo* ist einer der wesentlichen Stimuli für die Transkription und damit die Produktion bakterielles Endotoxin. Aber auch andere mikrobielle Produkte, Komplementkomponenten, Thrombin oder andere Zytokine können zur IL-1 Transkription und Translation beitragen.<sup>58</sup> Nach genannter Stimulation wird IL-1 $\beta$  vor allem von Monozyten und Makrophagen, aber auch durch viele andere Zellen wie z.B. Thrombozyten, Megakaryozyten, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen und Osteoblasten sezerniert.<sup>154,266</sup> In seiner maturen Form spielt IL-1 $\beta$  eine zentrale Rolle bei akuten und chronischen, sowohl lokal als auch systemisch ablaufenden Entzündungen wie Infektionen, Septikämien, Autoimmunerkrankungen und Neoplasien.<sup>55,56,58</sup> Wie heute bekannt ist besteht die wesentliche Hauptfunktion von IL-1 $\beta$  - als so genanntem proinflammatorischen Zytokin - in der Initiation der Inflammation. Dies bedeutet, dass IL-1 $\beta$  ein vielfältiges Aufgabengebiet besitzt. So veranlasst, um nur einige Aufgaben zu nennen, IL-1 $\beta$  Gefäßendothelzellen zur Freisetzung von Chemokinen wie MCP-1 und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 etc. Ebenso fördert und induziert es im Zusammenspiel mit IL-12 die Sekretion von IFN-gamma durch NK-Zellen, was zur Aktivierung von Makrophagen führt. Die in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  vermehrt auf den Zellen exprimierten Metalloproteinasen (*MMPs*) sorgen für eine verstärkte Migration von Monozyten ins Entzündungsgebiet. Die Funktion von IL-

1 $\beta$  ist nicht nur auf seine Aufgaben im Rahmen von Entzündungsprozessen beschränkt. So ist IL-1 $\beta$  entscheidend an osseären Um- und Aufbauprozessen sowie an vielfältigen endokrinologischen Funktionen, wie z.B. der Insulinsekretion oder auch an der Regulierung des Appetits, beteiligt. Durch Einwirkung auf den Hypothalamus und Mobilisierung von Proteinen aus Fett- und Muskelzellen hat IL-1 $\beta$  maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung und Bereitstellung der Energie zur Erhöhung der Körpertemperatur.<sup>58</sup> Diese spielt eine entscheidende Rolle bei der Verminderung der viralen und bakteriellen Replikation, schnelleren Antigenverbreitung und verstärkten Immunreaktion.

Der so genannte **VEGF** spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese und Inflammation.<sup>42,65,192</sup> Derzeitig sind sechs Mitglieder der VEGF-Familie bekannt, deren genaue Funktion teilweise noch erforscht wird: VEGF-A (wird im folgenden als VEGF bezeichnet), VEGF-B<sup>195</sup>, VEGF-C<sup>127</sup>, VEGF-D<sup>69,153</sup>, sowie der placenta growth factor (PlGF) und virale Homologe von VEGF, als VEGF-E bezeichnet.<sup>175,256,279</sup> VEGF-B scheint vor allem für die Ausbildung der Koronarvaskularisierung verantwortlich zu sein<sup>14</sup>, VEGF-C vor allem für die Entwicklung des Lymphgefäßsystems.<sup>125</sup> Die Aktivität von PlGF ist möglicherweise auf Umbildungsprozesse im ausgereiften Blutgefäßsystem beschränkt.<sup>36</sup>

Die Bezeichnung VEGF<sup>71</sup> hat sich im Laufe der Zeit gegenüber den Namen *vascular permeability factor* VPF<sup>146,236,244</sup> und Vasculotropin<sup>97</sup> durchgesetzt, nachdem sich herausstellte, dass es sich bei den von den verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebenen Faktor um dasselbe Hormon handelt. Natives VEGF ist ein basisches, heparinbindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa.<sup>71</sup> und gilt als potentester Stimulus für die Angiogenese. VEGF kommt in fünf verschiedenen Formen vor, die aufgrund ihres Unterschiedes in der Anzahl der Aminosäuren als VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> bezeichnet werden.<sup>71,200,208,250</sup> Dabei handelt es sich bei VEGF<sub>165</sub> um die dominierende der Isoformen, die von einer Vielzahl kultivierter Zellen so z.B. Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten<sup>29</sup>, Osteoblasten oder auch Tumorzellen sowie in den meisten Geweben z.B. Milz, Leber, Niere und Gehirn gebildet wird. Lediglich in der Plazenta überwiegt VEGF<sub>121</sub>.<sup>71,256</sup> Darüber hinaus enthalten Thrombozyten vergleichbar große Mengen an VEGF wie Tumorzellen und gelten als Haupttransporter für

VEGF. Bei beiden Isoformen handelt es sich um serumlösliche Proteine, die in das Medium der produzierenden Zelle sezerniert werden.<sup>73,200</sup> Die Expression der beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen Flt-1 (fms-like-tyrosine-kinase, VEGFR-1), KDR (kinase insert domain-containing receptor, VEGFR-2) und Flt-4 (VEGFR-3), über die VEGF seine Wirkung entfaltet ist im adulten Organismus weitgehend auf Endothelien beschränkt.<sup>69,149</sup> ,

Während der Embryogenese und der frühen postnatalen Phase findet unter dem Einfluss von VEGF die Ausbildung des Gefäßsystems statt. Beim adulten Menschen ist eine physiologische Gefäßsystemneubildung nur noch im Bereich der proliferativen Phase der Wundheilung und im weiblichen Reproduktionssystem für die zyklische Blutgefäßproliferation zu beobachten.<sup>72,192</sup> VEGF wirkt mitogen auf arterielle, venöse und lymphatische Endothelzellen und führt über sogenannte antiapoptotische Signalwege zu einer verlängerten Überlebenszeit der Endothelzellen. Des Weiteren steigert VEGF die Permeabilität des Gefäßendothels<sup>62,66</sup> durch Degradierung der Basalmembran und extrazellulären Matrix durch proteolytische Enzyme und ermöglicht somit die Migration von z.B. Plasmaproteinen bzw. Plasmafibrinogen zur Ausbildung eines extravasalen Fibringels.<sup>63</sup> Dieses dient als Matrix für das Wachstum von Endothelzellen während der Wundheilung. Ebenso ermöglicht VEGF aber auch die Migration von Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen.<sup>218</sup> Dieses Phänomen ist im Besonderen in Tumoren zu beobachten.<sup>64,65,236</sup> Daraus resultiert eine sehr gute Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, aber auch im Rahmen einer Chemotherapie mit Medikamenten. Eine erhöhte VEGF-Konzentration und Angiogenese ist andererseits auch im Rahmen der rheumatischen Arthritis und der diabetischen Retinopathie zu beobachten. Chemotaktisch wirksam ist VEGF für Monozyten und Osteoblasten. Die Regulation enchondraler Knochenbildung und longitudinalen Knochenwachstums als Aufgabe von VEGF in der postnatalen Entwicklung wurde durch Gerber *et al.* beschrieben.<sup>92,93</sup> *In vivo* konnte ein für die sekundäre Hämostase interessanter Effekt gezeigt werden: VEGF führt in Endothelzellen und Monozyten zu einer Expression von *tissue factor*.

## 1.4 Fragestellung

In der akuten Phase der Inflammation und bei der primären Hämostase stehen die Thrombozytenaktivierung und Freisetzung der gespeicherten Mediatoren im Vordergrund. Ob darüber hinaus eine *de novo* Synthese dieser Faktoren in Thrombozyten stattfindet, ist umstritten. In der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob aktivierte Plättchen in der Lage sind, ausgehend von den vorhandenen Gentranskripten *de novo* Proteinsynthese zu betreiben und damit über einen längeren Zeitraum wirksame Substanzen (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Interleukine) zu sezernieren.

Dazu wurden die für die Wundheilung relevanten Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren IL-1 $\beta$ , einschließlich pro IL-1 $\beta$  und VEGF ausgewählt, welche zum einen in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten enthalten sind und bei deren Aktivierung freigesetzt werden, und deren Gentranskripte zum anderen ebenfalls in Thrombozyten nachgewiesen werden konnten.<sup>33,34</sup>

Die methodischen Ansätze beinhalteten die radioaktive Markierung von Proteinen und Auftrennung mittels Gelelektrophorese zum allgemeinen Nachweis der Neusynthese von Proteinen und dem gezielten Nachweis von VEGF, IL-1 $\beta$  und pro IL-1 $\beta$  mittels quantitativem ELISA. Ein besonderes Augenmerk wurde auf den Einfluss der Leukozytenkontamination in den Thrombozytenpräparationen gerichtet.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Probenmaterial

Die Thrombozyten wurden aus humanen Thrombozytenkonzentraten bzw. aus Citratblutproben gewonnen.

Die **Thrombozytenkonzentrate** wurden vom DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen in Mannheim hergestellt. Es handelte sich dabei um gepoolte Präparate, die aus den *buffy coats* von vier gesunden Vollblutspendern (500 ml) mit gleicher Blutgruppenzugehörigkeit, verschiedenem Alter und rein zufälliger Geschlechtszugehörigkeit hergestellt wurden. Bei der Auswahl der gepoolten Präparate wurden verschiedene Blutgruppen gewählt. Das menschliche Blut hat durchschnittlich eine Konzentration von  $3,4 \times 10^5$  PLT/ $\mu$ l. Ein Thrombozytenkonzentrat (TK) enthält in etwa 296 ml und ca.  $3,5 \times 10^{11}$  PLT, dies entspricht einer Konzentration von  $1,2 \times 10^6$  PLT/ $\mu$ l. Die Thrombozytenzahl in den verwendeten TKs wurde durch Messung am automatischen Analysegerät (CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200, Abbott) bestimmt. Dafür wurden jeweils 300  $\mu$ l TK eingesetzt. Im CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200 wird die Thrombozytenzahl durch Laserlichtstreuung bei einer Wellenlänge von 632,8 nm erfasst. Die Präzision des Gerätes wird als Variationskoeffizient (VK) % bei einem 95 %-Vertrauensbereich von n=20 Wiederholungsanalysen bei gleicher Probe angegeben. Ein 95 %-Vertrauensbereich bedeutet dabei, dass mindestens 19 von 20 Bestimmungen innerhalb der Grenzwerte liegen. Die Thrombozytenzahl in den durchgeführten fünfzehn individuellen Präparationen lag im Bereich von  $2,4-4,4 \times 10^{11}$  mit einem Mittelwert von  $3,3 \pm 0,2 \times 10^{11}$ , dies entspricht einer Konzentration von  $1,1 \times 10^6 \pm 0,2$  PLT/ $\mu$ l.

Das **Citratblut** wurde von gesunden Spendern verschiedenen Alters, rein zufälliger Geschlechtszugehörigkeit und mit unterschiedlichen Blutgruppenmerkmalen frisch entnommen. Das Volumen der Citrat-Monovette betrug 9 ml, das Verhältnis enthaltendes Citrat zu Blut betrug 1:10. Es wurden jeweils 4 Monovetten entnommen. Spenderabhängig lag die in sechs individuellen Präparationen mittels CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200 (Abbott) gemessene Thrombozytenkonzentration im Bereich von  $2,5-4,2 \times 10^5$  PLT/ $\mu$ l mit einem Mittelwert von  $3,1 \times 10^5 \pm 0,7$  PLT/ $\mu$ l.

## 2.1.2 Chemikalien und Lösungen

### 2.1.2.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

ADP	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco, Eggenstein
Acrylamid-Lsg. (30% Acrylamid/ 0,8% Bis-acrylamid)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Ampholyt 3-10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Aqua bidestilata	Roth, Karlsruhe
Bayol F	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CellLytic <sup>™</sup> -MT	Sigma, Deisenhofen
CHAPS	Roche, Mannheim
Complete (Protease-Inhibitor)	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
EDTA w/o Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
Glycerin	Merck, Darmstadt
Gly-Pro-Arg-Pro	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Iodacetamid	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin 200 mM/L	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM/L	Gibco, Eggenstein

L-Methionin (radioaktiv)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MEM, Alpha Modification	Sigma, Deisenhofen
MEM, Hepes Modification	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Braun, Melsungen
PBS-Lösung	Biochrom, Berlin
PMSF	Roche, Mannheim
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
SDS (Dodecylsulfat, Natriumsalz)	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Sigma, München
Thioharnstoff	Fluka, Neu-Ulm
Humanes Thrombin	Sigma, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, Deisenhofen
Triton X100	Sigma, Deisenhofen
T-Sol	Baxter, Unterschleißheim

#### 2.1.2.2 Kit-Systeme

Quantikine Humanes pro IL-1 $\beta$	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine Humanes VEGF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine HS Humanes IL-1 $\beta$	R&D Systems, Minneapolis, USA

#### 2.1.2.3 Arbeitsmaterialien

Autostop <sup>TM</sup> BC (Leukozytenadhäsionsfilter)	PALL, Dreieich
Blutbeutel	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Blutentnahmesystem/ S-Monovette (Citrat)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen Ecoject/Luer	Dispomed, Gelnhausen
Einmalspritzen BD Plastipak	Becton Dickinson, Bedford, USA
Filterpapierstreifen	BioRad, München
Glaspipetten / Costar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaspipetten / Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen



IPG Streifen / Immoboline Dry Stripes	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kanülen, 18Gx11/2	Terumo, Eschborn
Kryoröhrchen / Cryo.s™	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipetten / Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten / Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipetten / Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen / Mikro-Tip 10	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen / SafeSeal-Tips	Biozym Diagn., Hess.Oldendorf
Pipettenspitzen / Plastibrand Tips	Brand, Wertheim
Spritzenaufsätze	Becton Dickinson, Bedford, USA
Zentrifugenröhrchen / Eppendorfcups	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.2.4 Geräte

Abpressgerät Optipress II®	Baxter, Unterschleißheim
BAS Kassette 2040	Fujifilm, Düsseldorf
Blutanalysegerät CELL-Dyn® 3200	Abbot Laboratories, Abbott Park, USA
Brutschrank, CO <sub>2</sub> - Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Brutschrank, NuAire™ US Autoflow	NuAire™ Inc., Plymouth, USA
Durchflusszytometer/FACScan	Becton Dickinson, Bedford, USA
Elektrophoresezelle PROTEAN II	BioRad, München
Elektrophoresezelle Mini-PROTEAN II	BioRad, München
ELISA-Reader, Modell Sunrise™ Remote	Tecan, Crailsheim
Image Plate MS	Fujifilm, Düsseldorf
Multiphor-Einheit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phosphorimager BAS-2500	Fujifilm, Düsseldorf
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank, Typ MRF-8	Steag, Pliezhausen
Dri-Block DB-2A	Techne (Barloworld Scientific Ltd), Stone, UK

Vortexer, Mono-Mixer	Sarstedt, Nümbrecht
Wasserbad Julabo 13	Julabo, Seelbach
Zentrifuge/Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge/Standzentrifuge Rotanta P <sup>®</sup>	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge/Standzentrifuge Roto Silenta <sup>®</sup>	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge/Standzentrifuge Rotixa P <sup>®</sup>	Hettich, Tuttlingen

#### 2.1.2.5 Software

Aida 2.10	Fa. Raytest, Straubenhardt
Microsoft Excel 2000	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word 2000	Microsoft, Redmond, USA
Statistik Software SPSS 12.0	SPSS, Chicago, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Arbeitsweisen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank (MRF-8, Steag). Alle verwendeten Einweg-Verbrauchsmaterialien waren steril; mehrmals zu gebrauchende Materialien wurden autoklaviert. Medien und Pufferlösungen wurden sterilfiltriert. Die Thrombozyten wurden aus Thrombozytenkonzentraten bzw. aus Citratblut von gesunden Spendern (ohne Vorauswahl in Bezug auf Blutgruppe, Alter oder Geschlecht) gewonnen.

### 2.2.2 Thrombozytenpräparation für die radioaktive Proteinmarkierung

Hierzu wurde frisch entnommenes Blut verwendet. Es wurden jeweils 4 x 9 ml Citratblut 15 min bei 200 g (900 UPM,  $r = 152$ , Bremse 0) in der Standzentrifuge (Rotixa P<sup>®</sup>, Hettich) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation des Citratblutes entstand in den Röhrchen eine Schichtung: Als Sediment vornehmlich Erythrozyten, darüber der feine *buffy coat* aus Leukozyten und als Überstand das plättchenreiche Plasma (PRP) mit darin enthaltenen Thrombozyten und Leukozyten. Das PRP wurde vorsichtig abgenommen, ohne die *buffy coat* Schicht mit der Pipettenspitze zu berühren, und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Das PRP wurde nun durch einen Leukozytenadhäsionsfilter (Autostop<sup>TM</sup> BC, Pall) filtriert. Dazu wurde eine 20 ml Spritze mit passendem Adapter auf den zum Filter führenden Schlauch gesetzt und das PRP durch das Filtersystem geführt. Der Vorgang wurde wiederholt. Dem Filtrat wurden 300 µl zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des automatischen Analysegerätes (CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200, Abbott) entnommen und auf die gewünschte Menge von  $10^8$  Thrombozyten/2 ml unter Verwendung eines geeigneten Mediums (RPMI 1640 w 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> w/o L-Methionin und L-Glutamin, unter Zusatz von 200 mM L-Glutamin) eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  - Thrombozyten /µl. Restleukozytenzahlen waren mit diesem Verfahren nicht bestimmbar, da diese vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze lagen und wurden im FACScan (Becton Dickinson) mittels Durchflusszytometrie gemes-

sen. Die Restleukozytenzahl im PRP lag im Mittel bei  $0,714 \pm 1,113$  Leukozyten / $\mu$ l. Das nach der Zentrifugation 200 g (900 UPM, r= 152, Bremse 0) in einer Standzentrifuge (Rotixa P<sup>®</sup>, Hettich) entstandene Sediment mit den enthaltenen Leukozyten und Erythrozyten wurde mit einem Zelllysepuffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA) im Verhältnis 1:5 versetzt und für 15 min auf einem Wipptisch (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Die Erythrozyten wurden durch den Puffer lysiert und die Leukozyten durch eine folgende Zentrifugation in einer Standzentrifuge (Rotixa P<sup>®</sup>, Hettich) für 10 min bei 2000 g (3600 UPM, r=152, Bremse 0) isoliert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml PBS gelöst. Um die genaue Leukozytenzahl zu bestimmen, wurden wie zuvor 300  $\mu$ l für die Zellzählung im CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200 (Abbott) entnommen. Je nach Aufgabenstellung wurde dem PRP eine definierte Zahl von Leukozyten zugesetzt bzw. erfolgte eine Aktivierung der Zellen durch Thrombin, wie in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

**Tabelle 3.** PRP zum Einsatz in der 2 D-PAGE

<b>Ansatz</b>	<b>Vol.</b>	<b>PLT</b>	<b>WBC</b>	<b>Thrombin</b>
<b>1</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1-2 \times 10^2$	ohne
<b>2</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1-2 \times 10^2$	0,1U
<b>3</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	ohne
<b>4</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^5$	0,1U

**Tabelle 4.** PRP zum Einsatz in der 1 D-PAGE

<b>Ansatz</b>	<b>Vol.</b>	<b>PLT</b>	<b>WBC</b>	<b>Thrombin</b>
<b>1</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$2 \times 10^2$	ohne
<b>2</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$2 \times 10^2$	0,1 U
<b>3</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^3$	ohne
<b>4</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^3$	0,1 U
<b>5</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^6$	ohne
<b>6</b>	2 ml	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^6$	0,1 U

Zur radioaktiven Proteinmarkierung wurde jeder Probenansatz PRP (s.Tab.3 und 4) zunächst mit 5 µl  $^{35}\text{S}$ -Methionin versetzt (10 µCi /µl, dies entspricht einer Aktivität von 50µCi bzw. 1,85 MBq) und für 1 h vorinkubiert. Im Anschluss wurde definierten Proben 0,1U Thrombin (vgl. Tab. 3 und 4) hinzugefügt. Die folgende 24 h Inkubation erfolgte im Brutschrank (NuAire™ US Autoflow) bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub>. Danach wurde wie in Abschnitt 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben weiterverfahren:

### 2.2.3 Thrombozytenpräparation für die ELISA-Messungen

Ausgangsbasis für die in den ELISA-Experimenten eingesetzten Thrombozytenpräparationen waren vom DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen in Mannheim hergestellte Thrombozytenkonzentrate wie unter 2.1.1 bereits beschrieben. Die Vollblutpräparate wurden am Tag der Spende in der Produktionsabteilung des oben genannten Institutes weiterbehandelt. Unmittelbar nach der Spende wurde die Vollblutkonserve zunächst gewogen und auf einer Kühlplatte bei 4°C für 60-120 min zwischengelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4068 g in einer speziellen Blutbeutelzentrifuge (Roto Silenta®, Hettich, Tuttlingen). Nach der Zentrifugation ergab sich folgende Schichtung: als Sediment eine Schicht aus abgesetzten Erythrozyten, als Überstand das Plasma und als Grenzschicht zwischen beidem der so genannte *buffy coat*, wie in Abbildung 8 dargestellt. Mit Hilfe eines halbautomatischen Abpressgerätes (Optipress II®, Baxter, Unterschleißheim) wurden Plasma und *buffy coat* in einen an den Primärbeutel angeschweißten Beutel für Thrombozytenkonzentrate geleitet; das Erythrozytensediment verblieb im Primärbeutel. Dem Beutel für Thrombozytenkonzentrate (TK) wurde ein Stabilisierungsmedium (T-Sol Additivlsg.) hinzugefügt. Dieses System ruhte dann für 2,5 bis 4 h zur Desaggregation der Thrombozyten.



**Abb. 10:** Primärbeutel einer Vollblutspende nach der Zentrifugation. Die Erythrozyten haben sich als Sediment abgesetzt, das Plasma bildet den Überstand, die Grenze zwischen beidem bildet der so genannte *buffy coat*. (Quelle: DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH Mannheim, Abt. Produktion)

Dem Plasma und *buffy coat* enthaltenden Beutel wurde im Anschluß ein weiterer Blutbeutel für Babyblutkonserven angefügt und 50 ml des TKs in diesen Blutbeutel abgeführt. Diese Probe repräsentierte den Zustand ohne Leukozytenfiltration. Das Restvolumen wurde durch einen Adhäsionsfilter (Autostop<sup>TM</sup> BC) zur Leukozytendepletion filtriert. Spezifikationsgemäß wurden die Leukozyten auf eine Zahl von  $< 1 \times 10^6$  im Präparat reduziert. Dem Filtrat wurden, wie oben beschrieben, wiederum 50 ml entnommen und das Restvolumen weitere zweimal durch den Adhäsionsfilter filtriert. Auch hieraus wurden wie nach obiger Beschreibung 50 ml entnommen.

Es ergaben sich drei verschiedene Präparate:

1. PRP ohne Leukozytendepletion durch Filtration
2. PRP mit einmaliger Leukozytendepletion durch Filtration
3. PRP mit dreimaliger Leukozytendepletion durch Filtration

Unter sterilen Bedingungen wurden die TKs in drei 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon Blue Cup, 50 ml, Becton Dickinson) überführt und jeweils 500 µl zur Restleukozytenzählung (WBC) im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) und zur Bestimmung der Thrombozytenanzahl (PLT) im automatischen Analysegerät CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200 (Abbott) entnommen. In den Präparaten

ohne Leukozytendepletion lag die Restleukozytenzahl bei  $74,8 \pm 23,3$  WBC/ $\mu$ l. Nach einfacher Leukozytendepletion lag der Wert bei  $0,6 \pm 0,47$  WBC/ $\mu$ l und nach dreifacher Leukozytendepletion bei  $0,34 \pm 0,47$  WBC/ $\mu$ l. Die durchschnittliche Thrombozytenzahl in den Thrombozytenkonzentraten wurde bereits unter 2.1.1 genannt. Im Anschluß wurden die zunächst für 5 min bei 350 g (1200 UPM, r=152, Bremse 0) zentrifugiert (Rotanta P<sup>®</sup>, Hettich), um die sich noch in der Probe befindliche Erythrozyten zu pelletieren. Die Kontamination mit Erythrozyten ist herstellungsbedingt und liegt spezifikationsgemäß unter  $10^6$  Erythrozyten im Thrombozytenkonzentrat. Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen in 3 Zentrifugenröhrchen (Falcon Blue Cup, 50 ml, Becton Dickinson) überführt. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1200 g (2400 UPM, r=152, Bremse 0) für 15 min (Rotanta P<sup>®</sup>, Hettich). Die Überstände wurden verworfen. Die aus Thrombozyten bestehenden Pellets wurden in je 50 ml auf Raumtemperatur (RT) erwärmtem Waschpuffer (PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ /EDTA 5% im Verhältnis 9:1 gemischt) resuspendiert. Die Zentrifugation, das Verwerfen der Überstände und das Resuspendieren in Waschpuffer wurden je zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Pellets mit Minimum Essential Medium (MEM) auf jeweils 10 ml aufgefüllt und die Thrombozyten somit resuspendiert. Es wurden 500  $\mu$ l dieser Zellsuspension für die erneute Zellzählung von Thrombozyten (PLT) im CELL-Dyn<sup>®</sup> 3200 (Abbott) entnommen, um die Zellzahl mit auf Raumtemperatur gebrachtem Minimum Essential Medium (MEM) unter Zusatz von 200 mM L-Glutamin (2 ml pro 100 ml Medium)  $1 \times 10^6$  PLT/ $\mu$ l einzustellen.

Die isolierten Thrombozyten konnten nun direkt zur Herstellung von Thrombozytenfaktorenüberstand und -membranen verwendet werden. Es wurde wie folgt weiterverfahren:

#### 2.2.3.1 Herstellung der Thrombozytenfaktorenüberstände

Zur Gewinnung des aktivierten Faktorenüberstandes (Releasat) war es notwendig, die Thrombozyten mit Thrombin zu aktivieren. Thrombin ist einer der stärksten Thrombozytenaktivatoren.

Zunächst wurde eine 20 U/ml Thrombinstocklösung hergestellt. Dazu wurden 250 U Thrombin in 12,5 ml MEM gelöst. Die Lösung wurde bei -30°C gelagert. Pro ml Zellsuspension wurden 50 µl der 20 U/ml Thrombinstocklösung eingesetzt. Dadurch ergab sich eine Thrombinkonzentration von 1 U/ml. Um eine zu starke Aggregation der Thrombozyten durch Thrombin zu verhindern und somit die Thrombozyten wieder einfacher gleichmäßig resuspendieren zu können, wurde den Proben vor der Aktivierung GPRP (Glycin-Prolin-Arginin-Prolin) zugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Peptid, das an Fibrinogen bindet und Fibrinpolymerization und Thrombozytenaggregation unterbindet. GPRP blockiert dagegen nicht die Plättchenaktivierung und schwächt nicht die Wirkung des Agonisten Thrombin ab.<sup>176,177</sup> Die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C für 1 h. Während dieses Vorganges war zu beobachten, wie die Thrombozyten im Zentrifugenröhrchen leicht aggregierten. Danach wurde die Suspension für 15 min bei 1200 g (2400 Upm, r=152, Bremse 0) zentrifugiert (Rotanta P<sup>®</sup>, Hettich). Das aus aktivierten Thrombozyten bestehende Zellpellet wurde in derselben Menge MEM aufgenommen, wie zuvor als Releasate abgenommen wurde. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Konzentration der Thrombozytenbestandteile in der Releasate- und Thrombozytenpelletextraktionslösung gleich hoch war. Zur besseren Resuspension und gleichmäßigen Verteilung ruhten die Versuchsansätze für 30-60 min bzw. wurden auf einen Schüttler verbracht. Nachdem makroskopisch keine Thrombozytenaggregate mehr festzustellen waren, wurden erneut 300 µl zur Messung im Cell-Dyn<sup>®</sup> 3200 entnommen, um so eine Gleichverteilung der Thrombozyten zu überprüfen und diese bei der anschließenden Aliquotierung zu 1,4 ml in 1,8 ml Kryoröhrchen zu gewährleisten. Es erfolgte folgende Unterteilung:

- a. Proben ohne Inkubationszeit nach der Aktivierung
- b. Proben mit einer Inkubationszeit von 17-20 h nach der Aktivierung
- c. Proben mit einer Inkubationszeit von 17-20 h nach der Aktivierung, unter Zusatz von Puromycin



Bei dem in den Versuchen eingesetzten Puromycin handelt es sich um ein durch *Streptomyces alboniger* produziertes Aminoglykosid-Antibiotikum. Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Translation; dabei inhibiert es den Peptidyltransfer an den Ribosomen eukaryotischer und prokaryotischer Zellen. Es wurde zunächst eine Puromycin-Stocklösung hergestellt.<sup>181,255</sup> Dabei wurden 25 mg Puromycin in 0,5 ml MEM gelöst, portioniert und bei –30°C gelagert. Pro 1 ml Zellsuspension wurden 50 µg Puromycin eingesetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte über den angegebenen Zeitraum bei 37°C im Wärmeschrank.

Die unter a-c genannten Proben wurden im Anschluß an die Resuspension bzw. Inkubation in einer Eppendorf-Zentrifuge für 3 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Thrombozytenüberstand wurde unter sterilen Bedingungen ohne Berührung des Thrombozytenpellets abpipettiert, in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt und bei –30°C eingefroren.

#### 2.2.3.2 Herstellung der Thrombozytenextrakte

Die Thrombozytenpellets aller Proben wurden in 1 ml CelLytic™-MT resuspendiert. Dazu wurden die Proben für 30 s auf dem Vortexer durchmischt und danach für 20 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluß da ran erfolgte eine Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge für 10 min bei 12000 g. Der Überstand wurde dekantiert und in 1,8 ml Kryoröhrchen bei –30°C eingefroren.

Sowohl die Thrombozytenreleasate, als auch die Extrakte wurden zur Messung relevanter Wachstumsfaktoren mittels ELISA eingesetzt.

#### 2.2.3.3 Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin und ADP

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Thrombozyten zum einen mit einer Thrombinkonzentration von 1U/ml und 0,1 U/ml und zum anderen mit ADP anstatt des Thrombins aktiviert. Dabei wurde ADP in Konzentrationen von

20  $\mu\text{M/L}$  und 200  $\mu\text{M/L}$  eingesetzt. ADP bewirkt auf ähnliche Weise wie Thrombin eine Freisetzung von Mediatoren aus den Thrombozyten und eine Thrombozytenaggregation in vergleichbarer Stärke. Dazu wurde 100 mg ADP mit einem MG von 427.20 in 1,28 ml MEM gelöst und sofort in der Verdünnung 1:1000 (200  $\mu\text{M/L}$ ) weiterverwendet. Dieses Präparat wurde 1:10 verdünnt, um eine 20  $\mu\text{M}$  ADP-Lösung zu erhalten. In diesem Versuchsansatz kamen nur Thrombozytenkonzentrate nach dreimaliger Filtration durch den Leukozytenadhäsionsfilter (Autostop<sup>TM</sup> BC) zum Einsatz. Die Gewinnung und Aufbereitung der Thrombozyten erfolgte dabei wie bereits unter 2.2.3, 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben.

#### 2.2.4 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2 D-PAGE)

Die zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese wurde 1975 von O'Farrel entwickelt. Nach den beiden unabhängigen Kriterien „Ladung“ und „Molekulargewicht“ werden dabei Proteine aufgetrennt. Durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung verbesserten Görg und Mitarbeiter<sup>96</sup> das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit.

Der erste Schritt der zwei-dimensionalen Trennung von Proteinen nach O'Farrel<sup>194</sup> ist die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF). Dabei ist bei der 2 D-PAGE mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) der pH-Gradient fester Bestandteil des Gels, der durch Kopolymerisation der Immobiline<sup>®</sup> (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren entsteht. Für die einzelnen Proteinmoleküle bedeutet dies, dass sie sich innerhalb dieses pH-Gradienten durch das Gel bis zu der Stelle, an der die Nettoladung null ist, also der jeweilige isoelektrische Punkt erreicht ist, bewegen. Die zweite Dimension wird als vertikale SDS-Elektrophorese durchgeführt. Das Detergens SDS (Sodium-Dodecylsulfat) zerstört hierbei zum einen die Quartärstruktur von Proteinen und bindet zum anderen an hydrophobe Proteinbereiche. Durch die negativen Ladungen der zahlreich angelagerten Dodecylsulfate spielt die protein-eigene Ladung bei dieser Elektrophorese keine Rolle mehr und die Trennung erfolgt lediglich entsprechend der molekularen Masse. Die SDS-PAGE nach

Laemmli<sup>147</sup> ist zur Auftrennung und Massenbestimmung von Proteinen insbesondere auch mit geringen molekularen Massen geeignet.

#### 2.2.4.1 Durchführung der 2 D-PAGE

Das PRP wurde wie unter 2.2.2 und 2.2.2.1 vorbereitet. Im Anschluss an die Inkubation wurde das PRP in der Eppendorfszentrifuge für 10 min bei 15800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von jeweils 1ml IEF- Puffer zum Pellet erfolgte die Lyse.

##### **IEF-Puffer**

8 M/L Harnstoff

1 M/L Thioharnstoff

2 % CHAPS

1 % Triton X 100

80 mM/L DTT

20 mM/L Tris

2 % Ampholyt 3-10

0,5 x Complete (Protease-Inhibitor), d.h. 1 Mini-Tablette auf 40 ml

0,004 % Bromphenolblau (20 µl einer 2 % Lsg. in 80 % EtOH)

Diese Lösung wurde in 1 ml Aliquots abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde 0,2 mM/L PMSF hinzugegeben.

Die Lysate wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) eingefroren.

Vor dem Auftragen auf den Immoboline<sup>®</sup> IPG-Streifen (3-10, 18 cm, Amersham Pharmacia Biotech) wurden die frisch verwendeten oder aufgetauten Lysate 5 Minuten bei 15800 g in der Eppendorfszentrifuge (5415 D) zentrifugiert. Zur Rehydrierung der IPG-Streifen wurde jeweils 350 µl Proteinextrakt auf einen Streifen aufgetragen und dieser bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden die IPG-Streifen mit wenig Wasser abgespült um das Auskristallisieren des Harnstoffs auf der Oberfläche zu vermeiden und seitlich auf Papier abgetupft. Danach erfolgte die Montage in den sogenannten *Strip-Holder*

der Multiphor-Einheit (Amersham Pharmacia Biotech). An den Enden der IPG-Streifen wurde nun zunächst Filterpapier aufgelegt und im Anschluss daran die Elektroden auf ihm angebracht. Um die Streifen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine ausreichende Menge Bayol F (Serva) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte nach einem Gradientenprogramm:

<b>Spannung</b>	<b>Zeit</b>
0-150 V	1 min
150 V (konstant)	2 h
150-350 V	2 h
350-3500 V	8 h
3500 V (konstant)	10 h

Nach 51200 Vh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -20 °C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

Vor der SDS-PAGE wurden die IPG-Streifen nach Beendigung der 1. Dimension zunächst für die 2. Dimension zweimal für jeweils 15 min in 5 ml der Äquibrierungslösung geschüttelt, um einen optimalen Proteintransfer von der 1. zur 2. Dimension zu gewährleisten. Die Lösung des ersten Äquibrierschrittes enthielt zusätzlich 1 % (w/v) DTT, das der vollständigen Reduzierung von Disulfidbrücken dient. Die zweite Äquibrierungslösung beinhaltete 4 % Jodacetamid, das die Alkylierung von Sulfhydrylgruppen der Proteine und des restlichen DTT bewirkte und damit die Reoxidation während der Elektrophorese verhinderte.

#### **SDS-Äquibrierungslösung:**

6 M/L Harnstoff

30 % Glycerin (w/v)

2 % SDS

50 mM/L Tris-Base (pH 6,8)

Für die 2. Dimension wurden die äquilibrierten IPG-Streifen sofort auf ein SDS - Gel ohne Sammelgel mit einem Vernetzungsgrad von 8-20 % (18x20 cm,

Serva) gelegt und mit flüssiger, warmer 0,5 % Agarose in Tris-Glycin-SDS-Puffer (siehe unten, identisch mit dem Laufpuffer) unter Zusatz von 0,002 % Bromphenolblau (Farbstoff) eingegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die SDS-Gele in die Elektrophoreseapparatur (Protean II, BioRad) eingesetzt, die Kammer mit Laufpuffer (siehe unten) aufgefüllt und die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA ( $U_{\max}$  400 V) durchgeführt und der Lauf nach ca. 4 Stunden beendet, nach dem die Farbstofffront das Gelende erreicht hatte.

**Laufpuffer:**

192 mM/L Glycin

25 mM/L Tris

1 % (w/v) SDS

In *Auqa bideest*

Anschließend wurde das Gel in 10 % Essigsäure und 40 % Methanol für 3 h fixiert und in 20 % Ethanol äquilibriert; dazu wurde das Gel für 2 h in der Lösung sanft geschüttelt. Das Gel wurde nun auf einem Filterpapier (BioRad) mit einer auf der Oberfläche glatt anliegenden Plastikfolie bedeckt und für ca. 1 h zum Trocknen in den Geltrockner verbracht. Das Trocknen des Gels führt zur Wasserreduktion und somit zur Minimierung der Probenmatrix. Die Radioaktivität wird so weder gedämpft noch abgelenkt und der Abstand, den die Strahlungspartikel überwinden müssen ist so kurz wie möglich. Im Anschluß wurde eine Phosphorimagerplatte (Image Plate MS, Fujifilm) in einer BAS Kasette 2040 (Fujifilm) der Strahlung des getrockneten Gels für 3 Tage ausgesetzt. Die Analyse erfolgte in einem Phosphorimager (Fujifilm BAS-2500) mit Hilfe des Softwareprogramms Aida 2.10 (Fa. Raytest).

Bei diesem Verfahren werden statt Röntgenfilmen wiederverwendbare Phosphoreszenzplatten verwendet. Bei der Exposition wird hierbei durch die ionisierende Strahlung ein nicht sichtbares Bild auf der Platte entworfen. Dieses Bild wird mit einem Laser ausgelesen, wobei die BaFBr:Eu<sup>2+</sup>-Kristalle im Schirm blaues Licht (Phosphoreszenz) abgeben und in den Grundzustand zurückfallen. Das entstehende Licht wird durch Lichtleiter aus Fiberglas geleitet, von einem Photomultiplier verstärkt und digitalisiert, damit man ein quantitatives

Bild der Probe bekommt. Die Visualisierung und Quantifizierung wird mit einem Bildanalyseprogramm durchgeführt.

### 2.2.5 Ein-dimensionale Gelelektrophorese (1 D-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine basiert auf der so genannten SDS-PAGE - Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - nach Laemmli.<sup>147</sup> Dabei wird die sich im elektrischen Feld befindende Proteinfraction der Probe ihres Molekulargewichtes nach aufgetrennt (s. 2.2.4).

#### 2.2.5.1 Durchführung der 1 D-PAGE

Das PRP wurde wie unter 2.2.2 und 2.2.2.1 vorbereitet. Alle Ansätze wurden für 24 Stunden bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschliessend für 10 min bei 2000 g (3600 UPM, r=152, Bremse 0) zentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und direkt weiterverwendet. Die Pellets wurden mit 2 ml CellLytic™-MT (Sigma) versetzt, bei 4°C für 15 Minuten inkubiert und erneut zentrifugiert (15800 g, 5 min, Eppendorfszentrifuge 5415 D). Der gewonnene Überstand mit enthaltenen Proteinen über dem aus Zelltrümmern bestehenden Pellet wurde in andere Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und im Anschluss der jeweilige Proteingehalt bestimmt.

Es wurde eine vertikale Elektrophorese mit dem Modell Mini-Protean II der Fa. BioRad, München durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist im Anschluss aufgelistet. Das Trenngel wurde nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED zwischen die Glasplatten bis ca. 1,5 cm unter den Rand gegossen und mit einigen Tropfen 1-Butanol überschichtet, um beim Auspolymerisieren des Trenngels zu gewährleisten, dass sich eine ebene Grenzfläche zwischen Trenngel und Sammelgel bildete. Nach der vollständigen Auspolymerisation wurde vor dem Gießen des Sammelgels das 1-Butanol zusammen mit der entstandenen Wasserschicht abgenommen. Im Anschluss wurde der Probenkamm eingesetzt und die Sammelgellösung so auf das Trenngel gegossen, daß die Taschen für die Proben ausgespart blieben. Der

Probenkamm wurde nach der Polymerisation erst unmittelbar vor der Verwendung des Gels entfernt.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde jedem Überstand 100 µl SDS-Probenpuffer (Laemmli<sup>147</sup>, siehe Kapitel 2.2.4.1) hinzugefügt, die Proben 5 min im Heizblock (Dri-Block DB-2A, Techne) bei 95°C erhitzt. Der Probenkamm wurde aus dem Gel entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Im Anschluß wurden jeweils 30 µl in die Vertiefungen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte über ca. 1,25 h bei 200 V und 25 mA. Die weitere Ausführung und Analyse erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

### **SDS-Gel** (Rezeptur für 2 Minigele in der Mini Protean II, BioRad)

Trenngel: (12,5 %) Sambrook et al. 1989

1,5 M/L Tris-HCl (pH 8,8) 3 ml

*Aqua bidest* 4 ml

Acrylamidlg. 5 ml (es handelt sich um 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid)

SDS (10 %) 120 µl

Ammoniumpersulfat (10 %) 100 µl

TEMED (10 %) 10 µl

Sammelgel: (6 %)

1 M/L Tris-HCl (pH 6,8) 1,25 ml

*Aqua bidest* 2,5 ml

Acrylamidlg. 1 ml (es handelt sich um 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid)

SDS (10 %) 50 µl    APS (10 %) 20 µl    TEMED (10 %) 20 µl

### 2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Bei dem zur Quantifizierung von IL-1 $\beta$ , pro IL-1 $\beta$  und VEGF eingesetzten ELISA handelt es sich um einen so genannten *Sandwich* – ELISA. Dabei kommen zwei Antikörper zur Anwendung, die beide an unterschiedliche Epitope des nachzuwei-

senden Antigens binden. Die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper (Erstantikörper) sind an ein Trägermaterial adsorbiert oder chemisch gekoppelt. Während der Inkubationsphase binden sie das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase werden die frei in Lösung verbliebenen Antigene durch einen Waschschrift entfernt, so dass nur der Antigengebundene Erstantikörper zurückbleibt. Im nächsten Schritt wird ein mit einem Enzym - z. B. Meerrettichperoxidase, Alkalische Phosphatase und selten Glucoseoxidase - markierter Antikörper (Zweit- oder Detektionsantikörper) zugegeben; dieser bindet ebenfalls an die gebildeten Immunkomplexe. Durch einen weiteren Waschvorgang wird der Überschuss an vorhandenen Zweitantikörpern entfernt und im Anschluss ein Chromogen hinzugefügt. Das an den Zweitantikörper gebundene Enzym katalysiert eine Farbreaktion, wobei die Intensität der Farbe direkt mit dem Antigengehalt der Probe korreliert. Die entstandene Farbreaktion kann photometrisch erfasst werden.

#### 2.2.6.1 Durchführung der ELISAs

Zur Bestimmung der Konzentration von IL-1 $\beta$ , pro IL-1 $\beta$  und VEGF in Thrombozytenextrakten und Thrombozytenfaktorenüberständen (s. Kap. 2.2.3, 2.2.3.1, 2.2.3.2 und 2.2.3.3) wurden folgende kommerzielle Reagenziensysteme verwendet: Quantikine Human pro-IL-1 $\beta$  Immunoassay, Quantikine Human IL-1 $\beta$  Immunoassay „High Sensivity“ und Quantikine Human VEGF Immunoassay. Dabei wurden die entsprechenden Protokolle des Herstellers befolgt. Für jeden Versuchsansatz wurden jeweils 4 Parallelproben bestimmt. Zudem enthielt jede Versuchsreihe eine Negativkontrolle sowie Standardwerte in absteigender Konzentration zur Anfertigung einer Standardkurve. Diese wurden als Doppelwerte aufgetragen. Die Messung der Konzentration von pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  und VEGF erfolgte in Thrombozytenextrakten und Thrombozytenfaktorenüberständen wie in den Kapiteln 2.2.3.1, 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben.

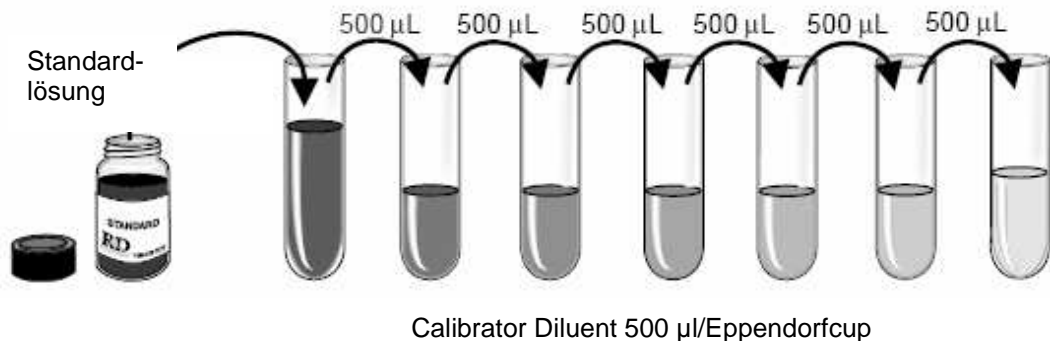
Die hier verwendeten Sandwich-Enzym-Immunoassays bestanden aus bereits vorgefertigten Mikrotiterplatten mit einer Beschichtung aus monoklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Zytokin bzw. den Wachstumsfaktor. Des Weiteren wurden für die quantitative Bestimmung der Interleukine bzw. des Wachstumsfaktors vom Hersteller folgende Lösungen zur Verfügung gestellt:



**Tabelle 6.** ELISA-Kit Reagentien

	<b>pro IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>VEGF</b>
<i>Conjugate</i>	IgG-Meerrettichperoxidase (HRP) polyklonaler AK	polyklonaler AK-alkal. Phosphatase (AP)	polyklonaler AK – Meerrettichperoxidase (HRP)
<i>Standard</i>	10000 pg/ml	80 pg/ml	2000 pg/ml
<i>Assay Diluent</i>	Protein-Pufferlsg.	Protein-Pufferlsg.	Protein-Pufferlsg.
<i>Calibrator</i>	Protein-Pufferlsg.	Protein-Pufferlsg.	Protein-Pufferlsg.
<i>Diluent</i>			
<i>Wash Buffer</i>	1: 25 Verdünnung mit Aqua dest.	1: 10 Verdünnung mit Aqua dest.	1: 25 Verdünnung mit Aqua dest.
<i>Concentrate</i>			
<i>Color Reagent A</i>	Hydrogenperoxid	---	Hydrogenperoxid
<i>Color Reagent B</i>	Tetramethylbenzidin	---	Tetramethylbenzidin
<i>Substrate</i>	---	NADPH	---
<i>Amplifier</i>	---	INT-violet	---
<i>Stop Solution</i>	Schwefelsäure	Schwefelsäure	Schwefelsäure

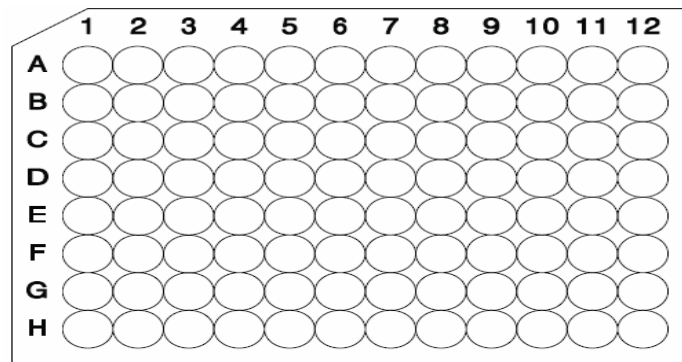
Zu Versuchsbeginn wurden alle ELISA-Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und die einzelnen Reagenzien nach Herstellerangabe vorbereitet. Mit Hilfe der Standardlösung und des *Calibrator Diluent*, welcher auch als Negativkontrolle fungierte (0 pg/ml), wurde zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden Eppendorfgefäße mit Calibrator Diluent (500  $\mu$ l) befüllt und eine definierte Menge der Standardlösung in das ersten Eppendorfgefäß zum *Calibrator Diluent* pipettiert. Dieser sanft geschüttelt bevor 500  $\mu$ l der ersten Verdünnungsstufe in den nächsten Eppendorfcup pipettiert wurden, wie in Abb. 11 dargestellt.



	pg/ml					
pro IL-1 $\beta$	750	375	187,5	93,8	46,9	23,4
IL-1 $\beta$	4	2	1	0,5	0,25	0,125
VEGF	500	250	125	62,5	31,2	15,6

**Abb. 11:** Erstellung der Verdünnungsreihe im ELISA-Versuch.

Als erster Schritt erfolgte die Zugabe des Assay Diluent zur Rehydratation der Antikörper auf der Mikroplatte. Im Anschluss wurden Standards, Leerwert und die Proben in die Wells pipettiert und das jeweilige Zytokin bzw. der Wachstumsfaktor band an die Antikörper der beschichteten Wells.



**Abb. 12:** 96-Well Microplatte

Nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit (siehe Tabelle 7) erfolgten mehrere Waschschritte, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Dazu wurden jeweils 400  $\mu$ l des Waschpuffers hineinpipettiert und wieder aspiriert. Dieser Vorgang wurde wiederholt durchgeführt und dabei insbesondere beachtet, dass die Flüssigkeit bei der Aspiration vollständig aus den Wells entfernt wurde. Nun wurde ein an Meerrettichperoxidase (HRP) bzw. alkalische Phosphatase (AP, im IL-1 $\beta$ -ELISA) gebundener polyklonaler Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin bzw. den zu bestimmenden Wachstumsfaktor zu-

gegeben. Nach erneuter Inkubation wurde das nicht gebundene Antikörper-Enzym-Reagenz durch wiederholte Waschschr tte entfernt. Als Substratlösung wurde Hydrogenperoxid mit dem gebundenen Farbstoff Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Das Substrat wurde von der Peroxidase mit  $H_2O_2$  als Co-substrat oxidiert und bewirkte einen Farbumschlag. Bei der Bestimmung von IL-1 $\beta$  wurde zunächst als Substrat NADPH zugeführt, welches durch die AP zu NADH dephosphoryliert wurde. NADH bewirkte die Reduktion des im Anschluss zugefügten, im Amplifier enthaltenen Farbstoffes Iodonitrotetrazolin-Violet und führte somit zum Farbumschlag. Die Farbintensität erwies sich als proportional zur Menge des umgesetzten Substrats, welche von der Menge des gebundenen Enzyms abhing. Diese war wiederum direkt propotional zur Menge des gebundenen Zytokins bzw. Wachstumsfaktor. Die Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure gestoppt und die Intensität der Farbe photometrisch im ELISA Reader (Modell Sunrise<sup>TM</sup> Remote) bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte bei 450 nm bei einer Wellenl ngenkorrektur von 570 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen.

**Tabelle 7.** Unterschiede in der Versuchsdurchführung der ELISA

	<b>pro IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>VEGF</b>
<i>Assay Diluent</i>	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Zugabe der Probe	200 $\mu$ l	150 $\mu$ l	200 $\mu$ l
1. Inkubationsschritt	1,5 h	3 h	2 h
Waschschr�tte	3x	6x	3x
Antiserum* <sup>1</sup>	100 $\mu$ l	---	---
Waschschr�tte	3x	---	---
<i>Conjugate</i> * <sup>2/3/4</sup>	100 $\mu$ l * <sup>2</sup>	200 $\mu$ l * <sup>3</sup>	200 $\mu$ l * <sup>4</sup>
2. Inkubationsschritt	30 min	2 h	2 h
Waschschr�tte	3x	6x	3x
Zugabe des Substrats	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
3. Inkubationsschritt	20 min bei RT	1h bei RT	20 min bei RT
<i>Amplifier</i>	---	50 $\mu$ l	---
4. Inkubationsschritt	---	50 $\mu$ l	---
Zugabe der Stoppl�sung	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

\*<sup>1</sup>polyklonaler AK gegen pro IL-1 $\beta$ , \*<sup>2</sup> IgG-HRP \*<sup>3</sup> polyklonaler AK-AP

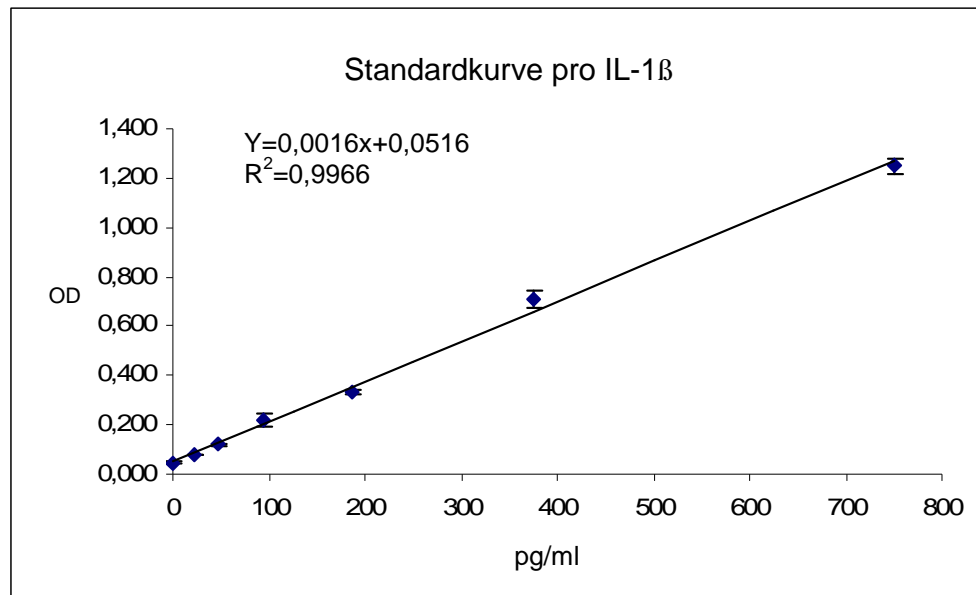
\*<sup>4</sup> polyklonaler AK-HRP

Eine Besonderheit des pro IL-1 $\beta$  ELISA war, dass der auf der Mikroplatte gebundene monoklonale Antikörper sich spezifisch gegen die pro-Einheit des Moleküls richtete und der hinzugefügte polyklonale Antikörper spezifisch an die mature IL-1 $\beta$ -Form bindet. Dadurch konnte garantiert werden, dass weder die pro-Einheit des Moleküls noch IL-1 $\beta$  einzeln detektiert wurden und der Nachweis spezifisch für intaktes pro IL-1 $\beta$  war.

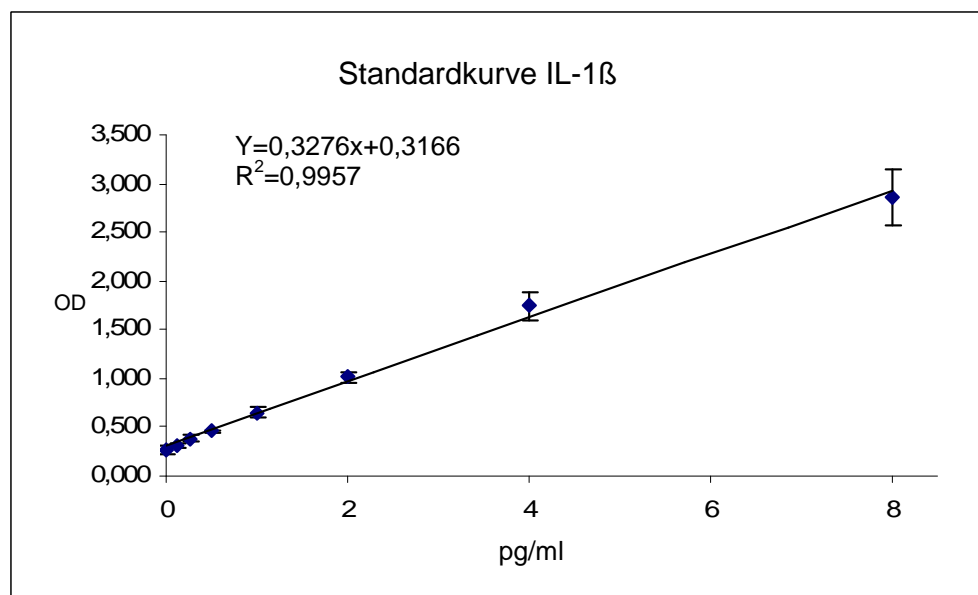
#### 2.2.6.2 ELISA-Standardkurven

In jedem Experiment wurde wie bereits unter 2.2.6.2 mittels der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Standardlösung eine Standardkurve erstellt, um anhand der gemessenen Extinktionswerte bzw. optischen Dichte die Konzentration bestimmen zu können. Dazu wurde mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft) eine Kurve (Kurvenart Punkt zu Punkt) erstellt, in dem die Standardkonzentration linear auf der X-Achse und die Standardextinktion linear auf der Y-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe dieser Standardkurve erfolgte schließlich die Bestimmung der Konzentration von pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  und VEGF durch die jeweiligen Adsorptionswerte.

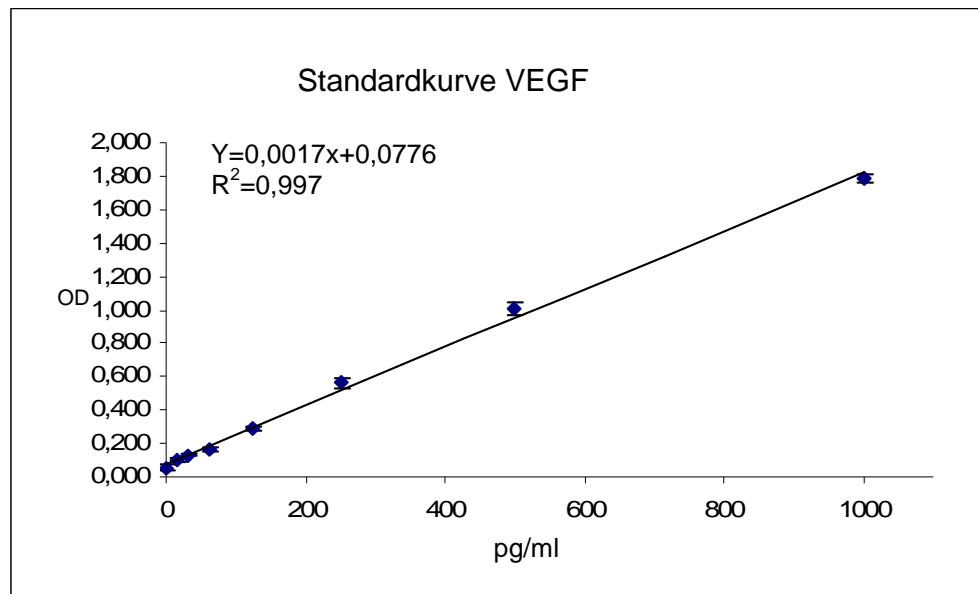
Die Herstellung und Messung der Standardlösung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten. Aus den Messwerten wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft) Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und in entsprechenden Standardkurven dargestellt (Abb. 13-15).



**Abb. 13:** Standardkurve zur Berechnung der Konzentration von pro IL-1β (Die Auftragung der Standardkonzentration erfolgte dabei auf der x-Achse, die der gemessenen optischen Dichte auf der y-Achse).



**Abb. 14:** Standardkurve zur Berechnung der IL-1β-Konzentration (Die Auftragung der Standardkonzentration erfolgte dabei auf der x-Achse, die der gemessenen optischen Dichte auf der y-Achse).



**Abb. 15:** Standardkurve zur Berechnung der VEGF-Konzentration (Die Auftragung der Standardkonzentration erfolgte dabei auf der x-Achse, die der gemessenen optischen Dichte auf der y-Achse).

### 2.2.7 Statistische Methoden

Zur statistischen Berechnung wurden jeweils die Werte der Einzelversuche zu Gruppenwerten zusammengefasst, die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichung des Mittelwertes (SD) wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2000 berechnet. Die statistische Signifikanz unterschiedlicher Zahlenwerte wurde mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA), die Signifikanzen wurden dabei durch eine lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test ermittelt, und des unabhängigen T-Tests berechnet. Die Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5% Irrtumswahrscheinlichkeit pro Parameter durchgeführt, d.h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens  $*p < 0,05$  wurde als signifikant, mindestens  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  als hochsignifikant betrachtet. Für dieses statistische Verfahren wurde das SPSS-Statistikprogramm, Version 12.0 genutzt.

In den ELISA-Versuchen wurden dazu die Ergebnisse der aktivierten Proben mit denen der zusätzlich inkubierten Proben, sowie die der Proben ohne Zusatz von Puromycin mit denen unter Zusatz von Puromycin nach Inkubation verglichen.

---

### 3 ERGEBNISSE

---

Thrombozyten spielen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Blutstillung und Blutgerinnung. Durch Ihre Aktivierung setzen sie gespeicherte Mediatoren frei und übernehmen somit wichtige Funktionen bei der sich anschließenden Wundheilung bzw. bei inflammatorischen Prozessen. Weitgehend unklar ist dabei jedoch, ob die Thrombozyten über eine nachhaltige Wirkung verfügen. In dieser Arbeit wird die Frage untersucht, ob Thrombozyten in der Lage sind, eine *de novo* Proteinsynthese zu betreiben und somit eine längerfristige Freisetzung von Mediatoren zu gewährleisten bzw. die Möglichkeit besitzen, durch *de novo* Proteinsynthese eigenständig ihre Speicher zu regenerieren.

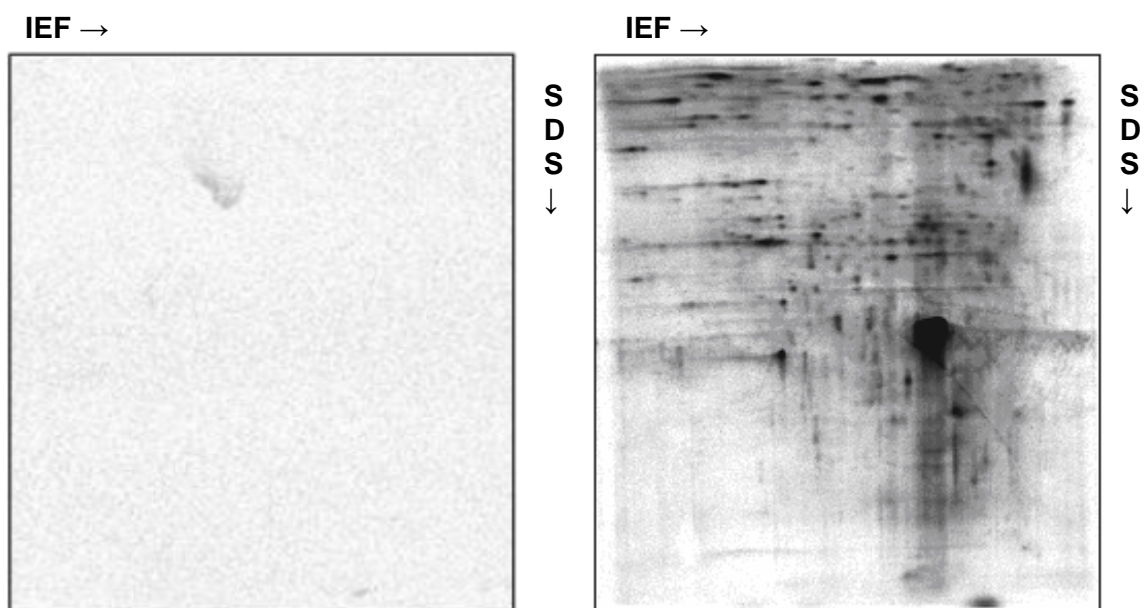
#### **3.1 Allgemeiner Nachweis von *de novo* Proteinbiosynthese in Thrombozyten**

##### **3.1.1 Radioaktive Proteinmarkierung und 2D-PAGE**

Zum Nachweis der Proteinbiosynthese in Thrombozyten wurde zunächst ein Verfahren eingesetzt, mit dem unspezifisch die Biosynthese von Proteinen gezeigt werden kann. Die Thrombozyten wurden aus 40 ml frisch entnommenem Citratblut isoliert, Leukozyten und Erythrozyten depletiert. Messungen der Restleukozyten ergaben Werte zwischen 100 - 200 WBC (Leukozyten) auf  $10^8$  PLT (Thrombozyten). Nach der Aufreinigung wurden die Thrombozyten in einem Vollmedium für die Kultivierung von humanen Zellen resuspendiert und auf die Zahl von  $10^8$  PLT pro Probe eingestellt. Durch das Vollmedium für die Kultivierung von humanen Zellen waren die für eine Proteinbiosynthese erforderlichen physiologischen Voraussetzungen gewährleistet. Die Proben wurden in Anwesenheit einer radioaktiv markierten Aminosäure ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) mit und ohne Thrombin als wichtigem Stimulans der Aggregation für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Den Vergleichsansätzen wurden jeweils  $4 \times 10^5$  WBC (autolog) hinzugefügt. Mittels 2D-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Protein-

extrakte aus den Ansätzen. Durch eine im Anschluß durchgeführte Autoradiographie konnten die radioaktiv markierten, aus der *de novo* Proteinbiosynthese entstandenen Proteine sichtbar gemacht werden.

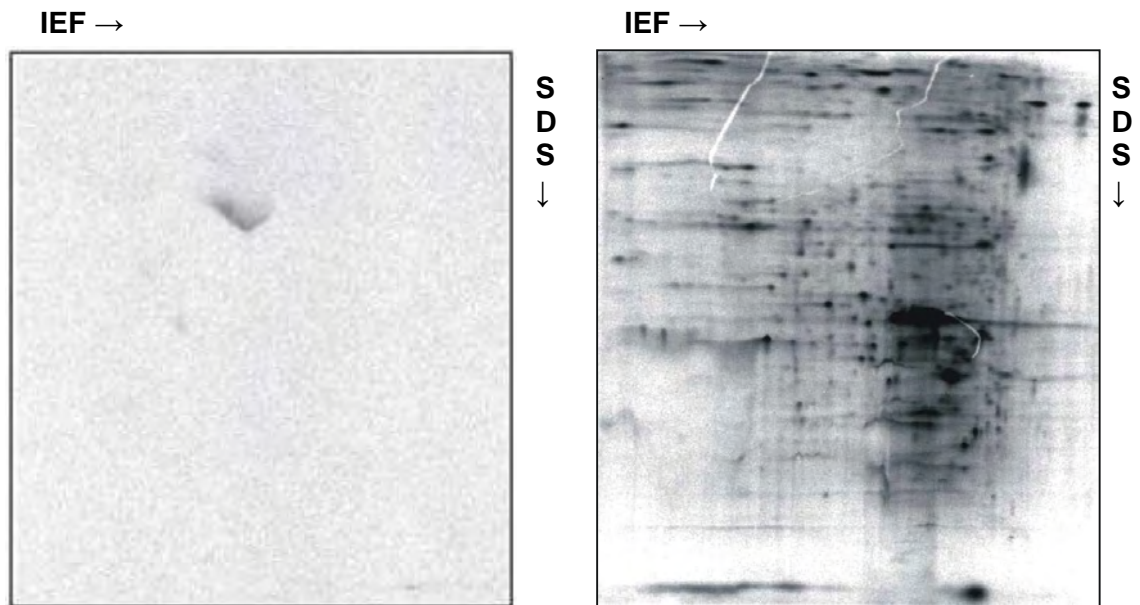
Ohne vorherige Stimulation der Zellen mit Thrombin konnten in den Thrombozytenpräparationen mit nur geringer Restleukozytenzahl kaum radioaktive Signale sichtbar gemacht werden (Abb. 16, Bild links), während in den Proteinextrakten aus den Ansätzen mit hoher Leukozytenzahl eine deutliche Markierung unterschiedlicher Proteine im 2D-Gel zu erkennen war (Abb. 16, rechts).



**Abb.16:** 2D-Gelelektrophorese zur Messung der *de novo* Proteinbiosynthese durch Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Thrombozytenpräparate, mit einer Thrombozytenzahl von  $10^8$  PLT/Ansatz nach Depletion der Leukozyten ( $\sim 100\text{-}200$  WBC/ $10^8$  PLT, links) und mit einem hohen Gehalt an Leukozyten ( $4 \times 10^5$  WBC/ $10^8$  PLT, rechts). Die 24h Inkubation im Vollnährmedium mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin erfolgte ohne Zugabe von Thrombin.

Nach erfolgter Zugabe von Thrombin als Thrombozyten-spezifischer Aktivator zum plättchenreichen Plasma konnten wiederum in den Thrombozytenpräparationen mit nur geringer Restleukozytenzahl kaum radioaktive Signale sichtbar gemacht werden (Abb. 17, links), während die detektierten radioaktiven Signale in den Präparationen mit hoher Anzahl von Leukozyten (Abb. 17, rechts) sehr deutlich die Markierung verschiedener Proteine zeigten.





**Abb. 17:** 2D-Gelelektrophorese zur Messung der *de novo* Proteinbiosynthese durch Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Thrombozytenpräparate, mit einer Thrombozytenzahl von  $10^8$  PLT/Ansatz nach Depletion der Leukozyten ( $\sim 100\text{-}200$  WBC/ $10^8$  PLT, links) und mit einem hohen Gehalt an Leukozyten ( $4 \times 10^5$  WBC/ $10^8$  PLT, rechts). Die 24h Inkubation im Vollnährmedium mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin erfolgte unter Zugabe von Thrombin.

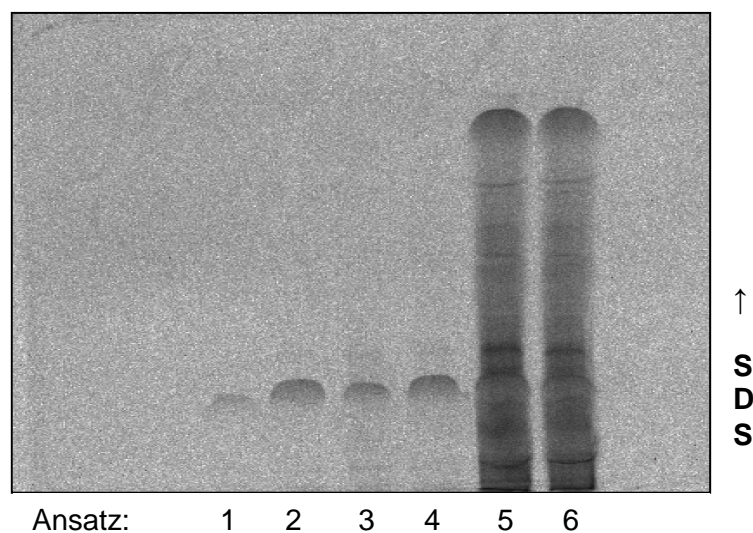
Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die in den unterschiedlichen Ansätzen nachgewiesene Proteinbiosynthese sehr stark mit der Anzahl der Leukozyten korreliert und dass unter den gewählten Bedingungen eine aktive Proteinbiosynthese der Thrombozyten unwahrscheinlich ist. Die sich nach der Zugabe von Thrombin zu den Thrombozytenpräparationen mit hoher Leukozytenzahl ergebenden Unterschiede in der Proteinmarkierung beruhen zum einen auf der direkten Stimulation der Leukozyten durch Thrombin, als auch zum anderen auf der zusätzlichen Aktivierung durch die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten.<sup>8,18,60,144,288,289</sup> Wesentliche Unterschiede in den Thrombozytenpräparationen mit nur geringer Restleukozytenzahl konnten durch Stimulation mit Thrombin nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund erfolgte auch keine spezielle weitere Auswertung zur Identifizierung von markierten Proteinen.

### 3.1.2 Radioaktive Proteinmarkierung und 1D-PAGE

In einem weiteren Einzelversuch erfolgte die Proteinmarkierung und Extraktion getrennt aus dem Mediumüberstand der aktivierten Thrombozyten bzw. aus

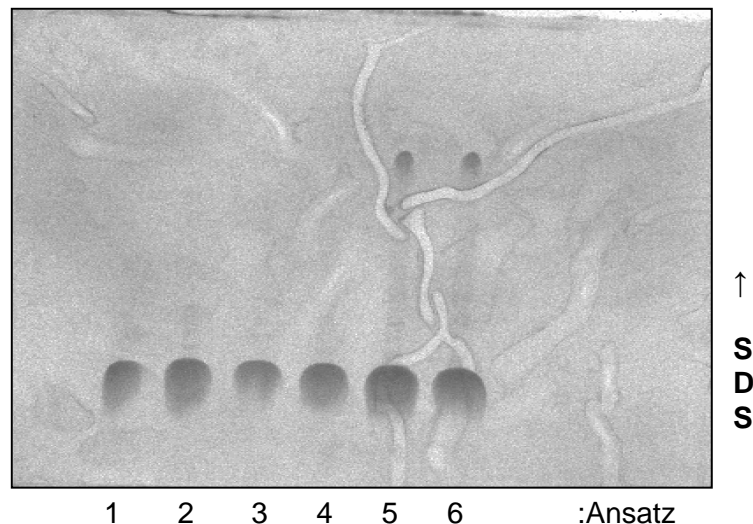
dem Extraktionsüberstand der aktivierten Thrombozyten. Des Weiteren wurde die Anzahl der Leukozyten variiert.

Auch hier erfolgte die Extraktion der Thrombozyten aus 40 ml frisch entnommenem Citratblut, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die absolute Zellzahl der Thrombozyten wurde auf  $10^8$  PLT pro Ansatz eingestellt. Die Messergebnisse der Restleukozytenzählung lagen wiederum zwischen 100 – 200 WBC in  $10^8$  PLT. Die Proben wurden in Anwesenheit einer radioaktiv markierten Aminosäure ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) mit und ohne Thrombin 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Den Vergleichsansätzen wurden jeweils  $10^3$  bzw.  $10^6$  WBC (autolog) hinzugefügt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Ansätze abzentrifugiert. Direkt im Anschluß erfolgte mittels 1D-Gelelektrophorese die Auftrennung der Proteinextrakte aus den Mediumüberständen der Ansätze. Das verbliebene Zellpellet wurde in einem Zellysepuffer (CellLytic, Sigma) inkubiert und erneut zentrifugiert, bevor die Auftrennung des Extraktionsüberstandes der Ansätze mittels 1D-Gelelektrophorese erfolgte. Die radioaktiv markierten, durch *de novo* Proteinbiosynthese entstandenen Proteine wurden durch Autoradiographie detektiert.



**Abb. 18:** Messung der *de novo* Proteinbiosynthese durch Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Thrombozytenpräparationen aus dem Extraktionsüberstand: nach Depletion der Leukozyten ( $\sim 200$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 1+2), mit einem mittleren Leukozytengehalt ( $10^3$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 3+4) bzw. mit einem höheren Leukozytengehalt ( $10^6$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 5+6). Die Inkubation im Vollmedium mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin erfolgte für 24 h mit (Ansatz 2+4+6) und ohne (Ansatz 1+3+5) Thrombin. Die autoradiographische Detektion der markierten Proteine erfolgte nach 1D-Gelelektrophorese.

In den Ansätzen mit hoher Leukozytenzahl aus dem Extraktionsüberstand zeigte sich eine deutliche Radioaktivmarkierung unterschiedlicher Proteine; diese war unabhängig von der Stimulation mit Thrombin (Abb. 18). In den leukozytenarmen Ansätzen und dem Mediumüberstand (Abb. 19) der leukozytenreichen Ansätze zeigt sich nur ein geringgradiger radioaktiver Einbau, auch dieser war von Thrombin unabhängig.



**Abb. 19:** Messung der *de novo* Proteinbiosynthese durch Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Thrombozytenpräparationen aus dem Mediumüberstand: nach Depletion der Leukozyten ( $\sim 200$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 1+2), mit einem mittleren Leukozytengehalt ( $10^3$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 3+4) bzw. mit einem höheren Leukozytengehalt ( $10^6$  WBC in  $10^8$  PLT, Ansatz 5+6). Die Inkubation im Vollmedium mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin erfolgte für 24 h mit (Ansatz 2+4+6) und ohne (Ansatz 1+3+5) Thrombin. Die autoradiographische Detektion der markierten Proteine erfolgte nach 1D-Gelelektrophorese.

Erneut konnte gezeigt werden, dass die in den unterschiedlichen Ansätzen festgestellte Proteinsynthese mit der Anzahl der Leukozyten korreliert. Die Tatsache, dass nur im Extraktionsüberstand (s. Abb. 18) eine *de novo* Proteinbiosynthese festzustellen war, beruht vermutlich darauf, dass die Leukozyten ihre Proteinbiosyntheseprodukte während der Inkubationsphase nicht an das Medium (s. Abb. 19) abgegeben, sondern intrazellulär gespeichert haben. Die Ergebnisse zeigten erneut, dass unter den gewählten Bedingungen keine aktive Proteinbiosynthese in Thrombozyten zu finden war.

### 3.2 Nachweis der *de novo* Proteinbiosynthese in Thrombozyten anhand von ausgewählten Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe der ELISA Methode gezielt die Freisetzung bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren gemessen. Kriterien für die Auswahl der speziellen Faktoren IL-1 $\beta$  und VEGF waren ihre besondere Relevanz im Hinblick auf die Wundheilung, ihr Vorhandensein in den Granula von Thrombozyten, sowie der in der Literatur beschriebene Nachweis der entsprechenden mRNA in Thrombozyten. Wie im Methodenabschnitt erläutert, wurden Thrombozytenkonzentrate verwendet, die aus den *buffy coats* von 4 Vollblutspenden hergestellt wurden. Diese wurden ohne Reduktion der Leukozyten bzw. nach ein- oder dreimaliger Filtration mittels eines Leukozytenadhäsionsfilters (Autostop<sup>TM</sup> BC; Pall, Dreieich) weiterverwendet. Die Restleukozytenzahlen sind in Kap. 2.2.3 angegeben. Die drei definierten Ansätze unterschieden sich hinsichtlich der Aktivierung, Inkubationszeit und der Verwendung eines Translationshemmers. Es wurde sowohl der Überstand als Releasat bzw. Mediumüberstand, als auch der Thrombozytenextrakt verwendet, um mittels ELISA zum einen die Konzentration der ins Medium sezernierten Wachstumsfaktoren und zum anderen die Konzentration der in den Thrombozyten gespeicherten Wachstumsfaktoren zu messen.

#### 3.2.1 Ergebnisse für pro IL-1 $\beta$

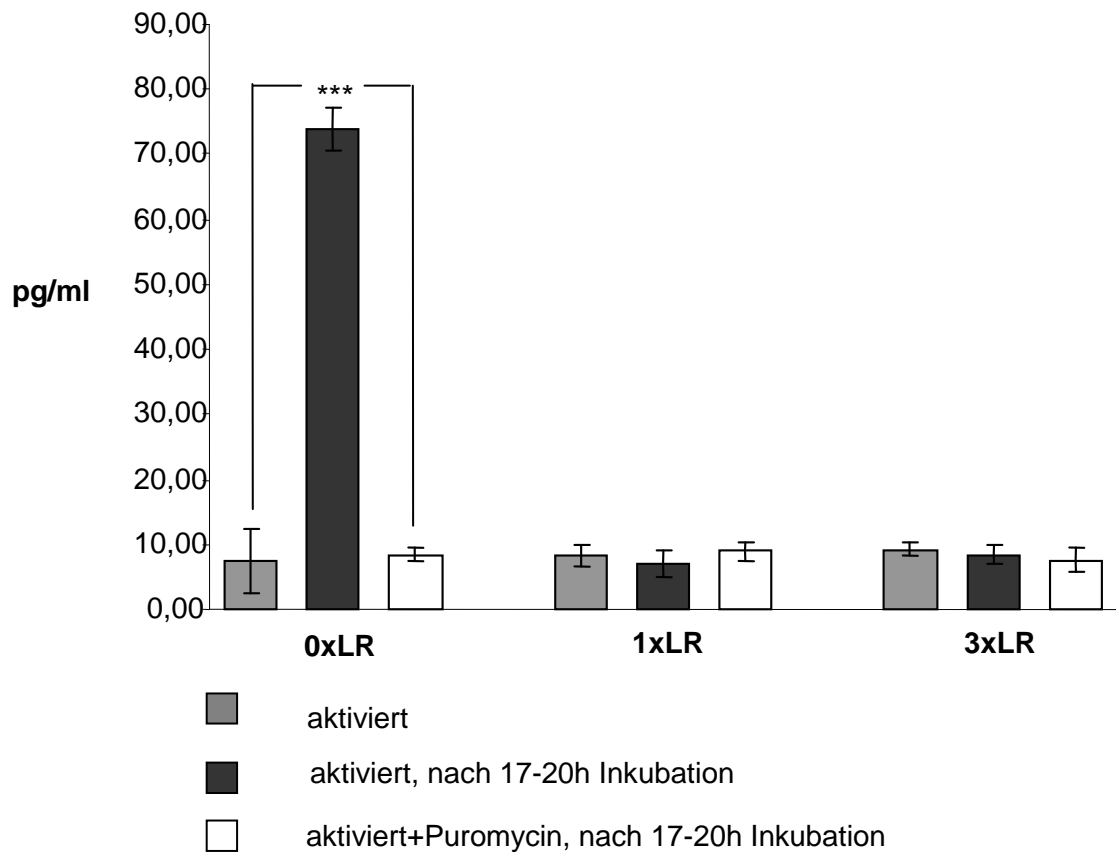
Bei pro IL-1 $\beta$  handelt es sich um den Vorläufer von IL-1 $\beta$ . Die Bestimmung der Konzentration von pro IL-1 $\beta$  erfolgte ausschließlich im Extraktionsüberstand (Abb. 21), da eine Freisetzung von pro IL-1 $\beta$  hauptsächlich erst nach Umwandlung in seine biologisch aktive Form IL-1 $\beta$  erfolgt.<sup>57</sup> Mit Hilfe der in Kapitel 2.2.6.2 Abb. 13 dargestellten Standardkurve bzw. mit der für sie errechneten Regressionsgeraden  $y = 0,0016x + 0,0516$  erfolgte die Kalibration der Extinktionswerte auf pg/ml. Das Bestimmtheitsmaß für die angegebene Formel war  $R^2 = 0,9966$ . Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente mit jeweils 4 Parallelproben durchgeführt. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den

Mittelwerten der Parallelproben der unabhängigen Experimente errechnet. Die Aussagefähigkeit der gemessenen Werte wurde durch Ermittlung der statistischen Signifikanz mittels eines T-Tests sowie der Varianzanalyse gestützt.

### 3.2.1.1 Die pro IL-1 $\beta$ -Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion

Das zur Herstellung der Proben verwendete PRP war anteilig nicht leukozytendepletiert „0“, bzw. durch einmalige „1“ oder dreimalige „3“ Filtration mittels eines Leukozytenadhäsionsfilters leukozytendepletiert. Anschließend wurden die Proben in Reihenfolge der ausgearbeiteten Ansätze ohne Aktivierung, mit Aktivierung, mit Aktivierung und Inkubation und zusätzlich unter Einfluss von Puromycin eingesetzt.

Die Messung der pro IL-1 $\beta$  Konzentration im Ansatz ohne Leukozytendepletion ergab direkt nach Aktivierung mit 1 Unit Thrombin pro  $10^6$  Thrombozyten einen Wert von  $7,33 \pm 4,88$  pg/ml. Nach 17-20 h Inkubation war die Konzentration auf  $73,93 \pm 3,39$  pg/ml gestiegen (Abb. 20). Unter Einfluss von Puromycin ergab sich eine vollständige Suppression der stimulierten pro IL-1 $\beta$ -Synthese, nach 17-20 h Inkubation betrug der gemessene Konzentrationswert für pro IL-1 $\beta$   $8,31 \pm 1,07$  pg/ml. Die statistische Auswertung ergab, sowohl im T-Test als auch in der Varianzanalyse, dass der Anstieg von pro IL-1 $\beta$  nach Inkubation hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) war (Abb. 20). Nach einmaliger Filtration des Thrombozytenkonzentrats durch den Leukozytenfilter betrug die Konzentration von pro IL-1 $\beta$  in den lediglich aktivierten Proben  $8,24 \pm 1,73$  pg/ml. Diese stieg nach der Inkubation nicht mehr an, der ermittelte Wert in diesen Proben betrug  $7,17 \pm 2,08$  pg/ml. Unter Einfluss von Puromycin war das Ergebnis nach Inkubation im Vergleich mit dem direkt nach der Aktivierung erhaltenem nahezu unverändert, die Konzentration von pro IL-1 $\beta$  betrug  $8,93 \pm 1,39$  pg/ml. Ein ähnliches Ergebnis ergaben die Messungen aus dem Ansatz nach dreimaliger Leukozytenreduktion. Für die aktivierten Proben ergab sich ein Wert von  $9,28 \pm 1,22$  pg/ml. Nach Inkubation lag der Konzentrationswert nahezu unverändert bei  $8,44$  pg/ml  $\pm 1,54$  pg/ml und unter Zusatz von Puromycin wurde ein Wert von  $7,61 \pm 1,77$  pg/ml gemessen.



**Abb. 20:** pro IL-1 $\beta$  Konzentration im thrombozytären Zellpellet nach Aktivierung mit Thrombin, mit/ohne Inkubation von 17-20h und mit/ohne Zusatz von Puromycin: ohne Depletion der Leukozyten (0xLR), nach einmaliger Depletion der Leukozyten (1xLR) und nach dreimaliger Depletion der Leukozyten (3xLR). Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) ( $n=3$ ).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Messungen von pro IL-1 $\beta$  aus dem Extraktionsüberstand zeigten, dass ein Konzentrationsanstieg von pro IL-1 $\beta$  in den nicht leukozytendepletierten, aktivierten Proben nach einer Inkubationszeit von 17-20 h stattfand. Nach Reduktion der Leukozyten war trotz einer Inkubationszeit von 17-20 h keine Zunahme der pro IL-1 $\beta$ -Konzentration zu verzeichnen. In den mit Puromycin versetzten Proben blieb die Konzentration von pro IL-1 $\beta$  nahezu unverändert im Vergleich mit den Proben ohne Zugabe von Puromycin, dies konnte statistisch belegt werden.

### 3.2.2 Ergebnisse für IL-1 $\beta$

Die Messung von IL-1 $\beta$  erfolgte separat im Extraktionsüberstand und im Mediumüberstand, um sowohl das neu gebildete und gespeicherte bzw. sezernierte IL-1 $\beta$  zu erfassen. Mit Hilfe der in Kapitel 2.2.6.2 Abb.14 dargestellten Standardkurve bzw. mit der für sie errechneten Regressionsgeraden  $y = 0,3276x + 0,3106$  erfolgte die Kalibration der Extinktionswerte auf pg/ml. Das Bestimmtheitsmaß für die angegebene Formel war  $R^2 = 0,9957$ . Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente mit jeweils 4 Parallelproben durchgeführt. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den Mittelwerten der Parallelproben der unabhängigen Experimente errechnet. Die Aussagefähigkeit der gemessenen Werte wurde durch Ermittlung der statistischen Signifikanz mittels eines T-Tests und der Varianzanalyse gestützt.

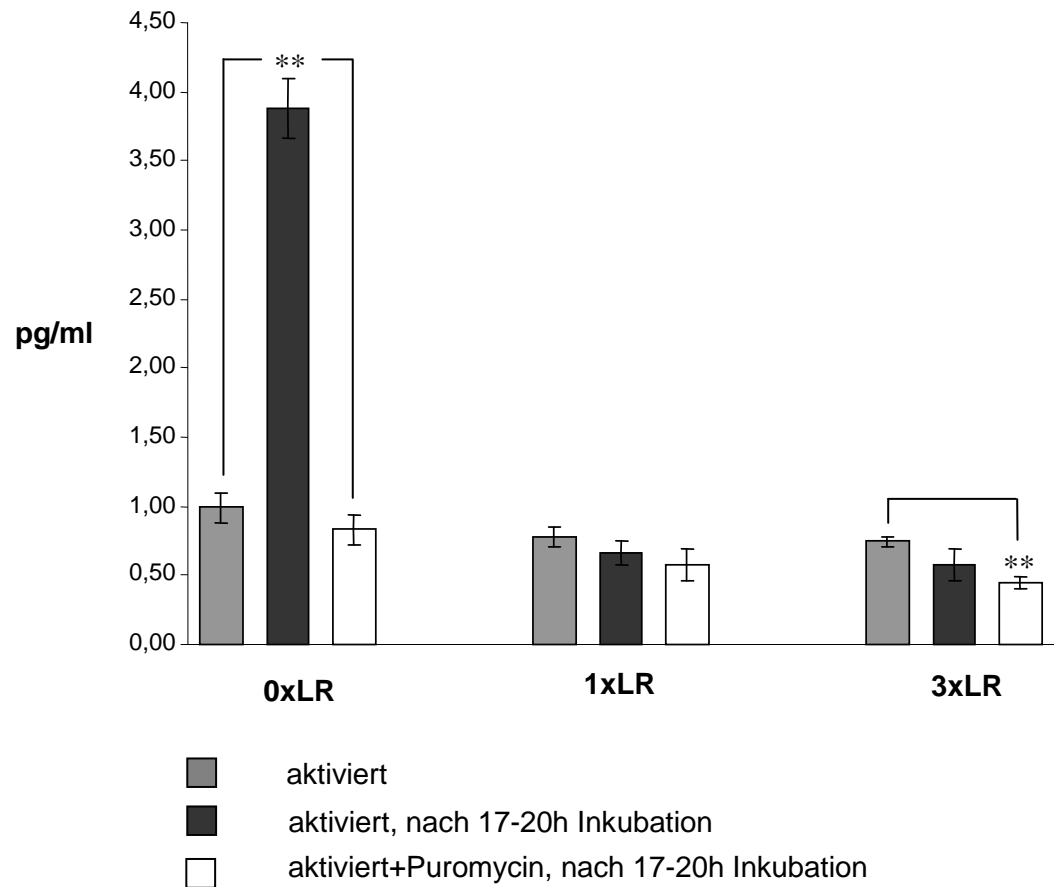
#### 3.2.1.2 Die IL-1 $\beta$ -Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion

Das zur Herstellung der Proben verwendete PRP war anteilig nicht leukozytendepletiert „0“, bzw. durch einmalige „1“ oder dreimalige „3“ Filtration mittels eines Leukozytenadhäsionsfilters leukozytendepletiert. Anschließend wurden die Proben in Reihenfolge der ausgearbeiteten Ansätze ohne Aktivierung, mit Aktivierung, mit Aktivierung und Inkubation und zusätzlich unter Einfluss von Puromycin eingesetzt.

Die Konzentration von IL-1 $\beta$  wurde zunächst getrennt vom Mediumüberstand aus dem extrahierten Zellpellet gemessen (Abb. 21).

Ohne vorherige Depletion der Leukozyten betrug die ermittelte IL-1 $\beta$  Konzentration nach einstündiger Aktivierung mit 1 Unit Thrombin pro  $10^6$  Thrombozyten  $0,99 \pm 0,10$  pg/ml. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 17-20 h hatte sich die Konzentration von IL-1 $\beta$  auf  $3,88 \pm 0,22$  pg/ml nahezu vervierfacht. In Anwesenheit von Puromycin ergab sich eine vollständige Unterdrückung der stimulierten IL-1 $\beta$ -Synthese von 17-20 h und somit keine Zunahme der IL-1 $\beta$  Konzentration gegenüber der nach Aktivierung der Thrombozyten gemessenen beobachtet werden ( $0,83 \pm 0,11$  pg/ml). Die statistische Auswertung ergab, dass der Anstieg von IL-1 $\beta$  nach Inkubation im Vergleich mit den direkt nach

Aktivierung und unter Zusatz von Puromycin ermittelten Werten signifikant war ( $p=0,001$ ) (Abb. 21).



**Abb. 21:** IL-1 $\beta$  Konzentration im thrombozytären Zellpellet nach Aktivierung mit Thrombin, mit/ohne Inkubation von 17-20h und mit/ohne Zusatz von Puromycin: ohne Depletion der Leukozyten (0xLR), nach einmaliger Depletion der Leukozyten (1xLR) und nach dreimaliger Depletion der Leukozyten (3xLR). Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ) ( $n=3$ ).

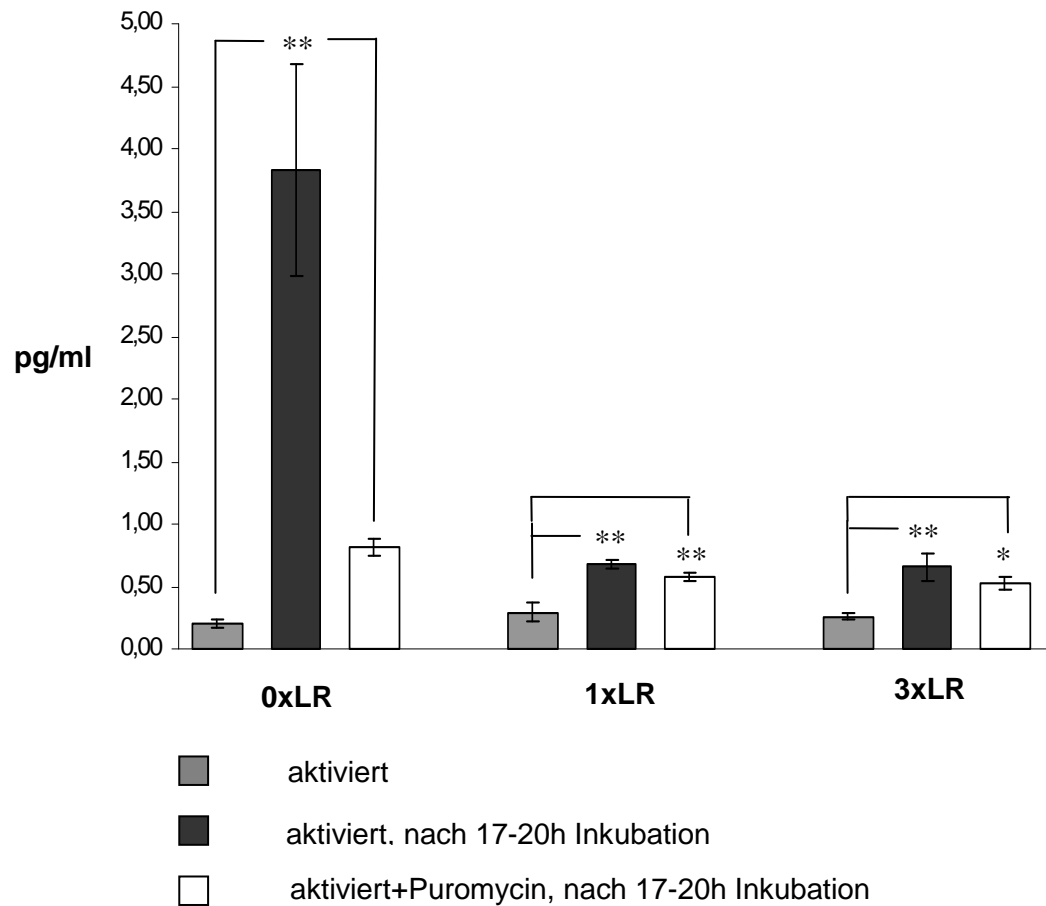
Nach einmaliger Filtration des Thrombozytenkonzentrats durch den Leukozytenfilter betrug der nach Aktivierung mit Thrombin gemessene Wert für die IL-1 $\beta$  Konzentration  $0,78 \pm 0,08$  pg/ml. Der Anstieg nach 17-20 h Inkubation blieb nach Reduktion der Leukozyten ( $0,66 \pm 0,09$  pg/ml) aus. Der in Anwesenheit von Puromycin nach erfolgter Inkubation ermittelte Wert war im Vergleich zu den zuvor in dieser Versuchsgruppe gemessenen nahezu unverändert ( $0,58 \pm 0,11$  pg/ml). Das nach dreimaliger Reduktion der Leukozyten erzielte Ergebnis war vergleichbar mit dem nach einmaliger Leukozytenfiltration. Nach Aktivierung mit Thrombin betrug die Konzentration von IL-1 $\beta$   $0,75 \pm 0,04$  pg/ml, diese



stieg nach Inkubation von 17-20 h nicht an ( $0,58 \pm 0,12$  pg/ml); bei einer zusätzlichen Zugabe von Puromycin erwiesen sich die von IL-1 $\beta$ -Werte im Vergleich mit der Kontrolle als signifikant geringer ( $0,45 \pm 0,04$  pg/ml,  $p=0,008$ ). Das in diesem Versuch die Konzentration von IL-1 $\beta$ , unabhängig von der Leukozytendepletion, nach Zugabe von Puromycin und Inkubation geringer als direkt nach Aktivierung mit Thrombin war, ist vermutlich auf eine Freisetzungsreaktion von IL-1 $\beta$  ins Medium zurückzuführen.

Bei der Messung von IL-1 $\beta$  im thrombozytären Mediumüberstand (Abb. 22) ohne vorherige Leukozytendepletion wurde direkt nach der Aktivierung mit Thrombin eine Konzentration von  $0,20 \pm 0,04$  pg/ml gemessen. Ebenso wie in den Messungen aus dem thrombozytären Extrakt stieg die IL-1 $\beta$  Konzentration nach Inkubation auf  $3,83 \pm 0,85$  pg/ml an. Die statistische Auswertung ergab, dass der Anstieg von IL-1 $\beta$  nach Inkubation, im Vergleich mit den direkt nach Aktivierung und unter Zusatz von Puromycin, wiederum signifikant ( $p=0,002$ ) war. In Anwesenheit von Puromycin betrug die Konzentration von IL-1 $\beta$  nach Inkubation der Thrombozyten  $0,81 \pm 0,12$  pg/ml. Nach einmaliger Filtration des Thrombozytenkonzentrates durch den Leukozytenfilter betrug der nach Aktivierung mit Thrombin gemessene Wert für die IL-1 $\beta$  Konzentration  $0,29 \pm 0,12$  pg/ml. Sowohl mit als auch ohne Zusatz von Puromycin war im thrombozytären Mediumüberstand ein signifikanter Anstieg der Konzentration von IL-1 $\beta$  nach 17-20h Inkubation zu erkennen (ohne Puromycin:  $0,68 \pm 0,11$  pg/ml,  $p=0,001$ ; mit Puromycin:  $0,58 \pm 0,15$  pg/ml,  $p=0,001$ ). Das nach dreimaliger Reduktion der Leukozyten erzielte Ergebnis war vergleichbar mit dem nach einmaliger Leukozytenfiltration. Nach Aktivierung mit Thrombin betrug die Konzentration von IL-1 $\beta$   $0,26 \pm 0,06$  pg/ml, diese stieg nach Inkubation von 17-20 h ( $0,65 \pm 0,17$  pg/ml,  $p=0,001$ ) und unter einer zusätzlichen Zugabe von Puromycin auf ( $0,52 \pm 0,08$  pg/ml,  $p=0,011$ ) an. Im Gegensatz zu den IL-1 $\beta$  Messungen im Thrombozytenextrakt zeigt sich, dass im Mediumüberstand die Konzentration von IL-1 $\beta$  - unabhängig von der Leukozytendepletion - nach Zugabe von Puromycin und Inkubation im Vergleich zur IL-1 $\beta$  Konzentration direkt nach Aktivierung angestiegen ist. Auch in diesem Fall ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine reine Freisetzungsreaktion aus dem Zytosol der Zellen während der Inkubation und nicht um eine Neusynthese von IL-1 $\beta$  handelt, da der

Anstieg in der IL-1 $\beta$  Konzentration auch in Anwesenheit des Translationshemmers Puromycin stattfand.



**Abb. 22:** IL-1 $\beta$  Konzentration im thrombozytären Mediumüberstand nach Aktivierung mit Thrombin, mit/ohne Inkubation von 17-20h und mit/ohne Zusatz von Puromycin: ohne Depletion der Leukozyten (0xLR), nach einmaliger Depletion der Leukozyten (1xLR) und nach dreimaliger Depletion der Leukozyten (3xLR). Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) (n=3).

Abschließend ist festzuhalten, dass in allen Experimenten und Messungen ein Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration in nicht leukozytenreduzierten Proben nach einer Inkubationszeit von 17–20 h zu verzeichnen war. Dass es sich hierbei um *de novo* Proteinbiosynthese handelte, konnte durch die Verwendung des Translationshemmers Puromycin gezeigt werden, der in der Lage war, den Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration vollständig zu unterbinden. In den einfach bzw. dreifach leukozytenreduzierten Proben konnte hingegen kein Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration gemessen werden. Lediglich im Mediumüberstand der leukozy-

tenreduzierten Proben war nach Aktivierung und Inkubation ein Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration festzustellen, was jedoch nicht auf Translationsprozesse zurückzuführen war.

### 3.2.3 Ergebnisse für VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF spielt, ebenso wie IL-1 $\beta$ , bei der Entstehung und Erhaltung der Entzündung, aber auch insbesondere bei der Angiogenese, eine wichtige Rolle. Durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität ermöglicht er das Einwandern von Entzündungszellen.

Die Messung von VEGF erfolgte separat im Extraktionsüberstand und im Mediumüberstand, um sowohl das neu gebildete und gespeicherte bzw. sezernierte VEGF zu erfassen. Mit Hilfe der in Kapitel 2.2.6.2 Abb. 15 dargestellten Standardkurve bzw. mit der für sie errechneten Regressionsgeraden  $y = 0,0017x + 0,0776$  erfolgte die Kalibration der Extinktionswerte auf pg/ml. Das Bestimmtheitsmaß für die angegebene Formel war  $R^2 = 0,997$ . Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente mit jeweils 4 Parallelproben durchgeführt. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den Mittelwerten der Parallelproben der unabhängigen Experimente errechnet.

#### 3.2.3.2 Die VEGF-Expression in Abhängigkeit von der Leukozytendepletion

Wie bereits in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, wurde auch in dieser Versuchsreihe das zur Herstellung der Proben verwendete PRP anteilig nicht leukozytendepletiert „0“, bzw. durch einmalige „1“ oder dreimalige „3“ Filtration mittels eines Leukozytenadhäsionsfilters leukozytendepletiert. Anschließend wurden die Proben in Reihenfolge der ausgearbeiteten Ansätze ohne Aktivierung, mit Aktivierung, mit Aktivierung und Inkubation und zusätzlich unter Einfluss von Puromycin eingesetzt.

Die Konzentration von VEGF wurde zunächst getrennt vom Mediumüberstand aus dem extrahierten Pellet gemessen (ohne Abbildung). Dabei lag die Konzentration unabhängig von der Leukozytenkontamination, Aktivierung mit

Thrombin, Inkubationszeit und der Anwesenheit von Puromycin unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs von 5 pg/ml. Im Mediumüberstand konnte festgestellt werden, dass sich die Konzentration VEGF nach der Aktivierung mit Thrombin unabhängig von der Leukozytenkontamination – wie auch in den Messungen aus dem extrahierten Pellet - unter der Detektionsgrenze des ELISAs befand. Nach Inkubation von 17-20 h konnte eine VEGF-Konzentration von  $17,16 \pm 6,66$  pg/ml in den Proben ohne vorherige Leukozytendepletion (Restleukozytenzahl  $74,8 \pm 23,3$  WBC/ $\mu$ l) nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Puromycin konnte kein VEGF im thrombozytären Mediumüberstand detektiert werden. Erfolgte vor Aktivierung der Thrombozytenkonzentrate eine Depletion der Leukozyten, so war nach Inkubation von 17-20 h weder in den ohne, noch in den unter Zusatz von Puromycin durchgeführten Versuchen eine messbare VEGF Konzentration zu zeigen.

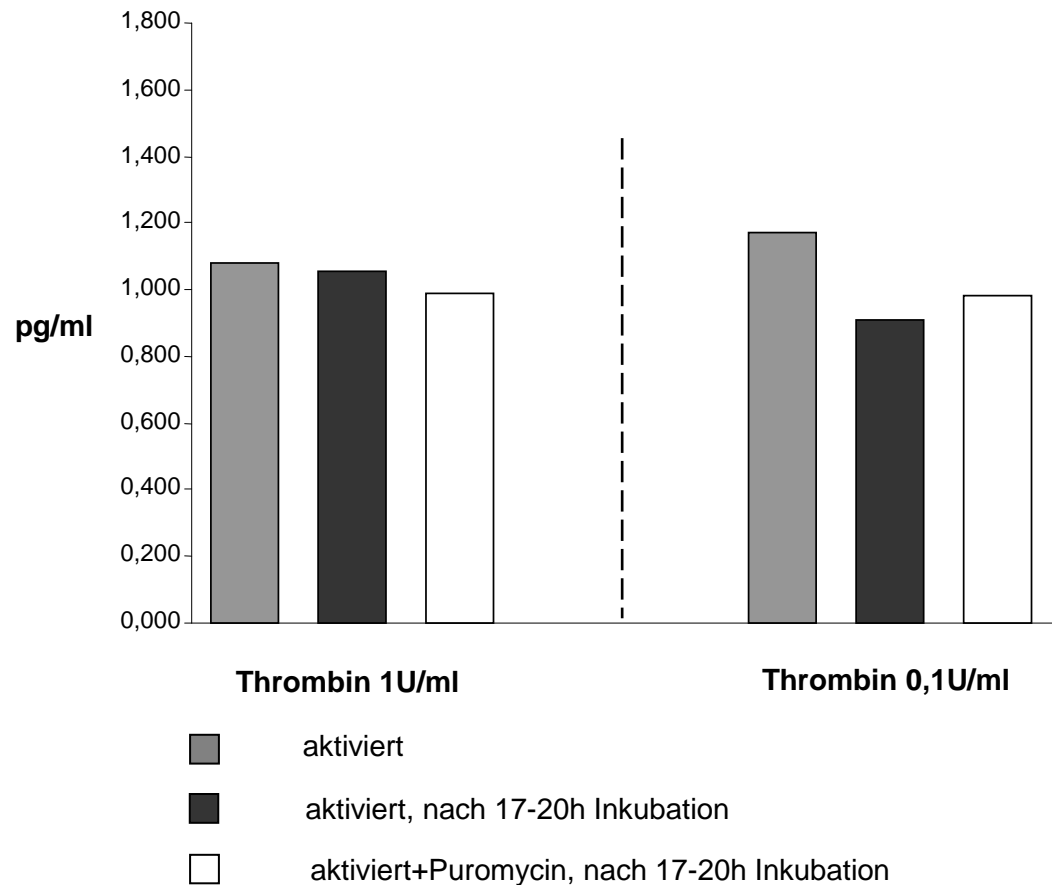
Zusammenfassend ist zu den Ergebnissen zu sagen, dass mit der gewählten Methode VEGF - und damit eine Synthese von VEGF - unabhängig von der Kontamination mit Leukozyten in den thrombozytären Extrakten nicht nachweisbar war.

### **3.2.4 Vergleichende Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin und ADP**

In einem weiteren Versuchsansatz wurden ausschließlich dreifach leukozytenreduzierte Thrombozytenpräparate unterschiedlich stimuliert, um herauszufinden, ob die Art der Stimulation Einfluss auf die Neubildung von Zytokinen, in diesem Fall IL-1 $\beta$ , hat.

Dazu wurden die Proben zum einen mit Thrombin in der Konzentration 1 U/ml bzw. 0,1 U/ml, zum anderen mit ADP in der Konzentration 200  $\mu$ M/L bzw. 20  $\mu$ M/L stimuliert. Zum Vergleich wurden wiederum lediglich aktivierte Proben solchen mit einer Inkubationszeit von 17–20 h mit bzw. ohne Zusatz eines Translationshemmers in Form von Puromycin gegenübergestellt. Alle Messungen wurden getrennt im Extraktionsüberstand und im Mediumüberstand durchgeführt. Die Berechnung der Werte in pg/ml erfolgte wie unter 3.2.2 be-

schrieben. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit 2 Messwerten durchgeführt.

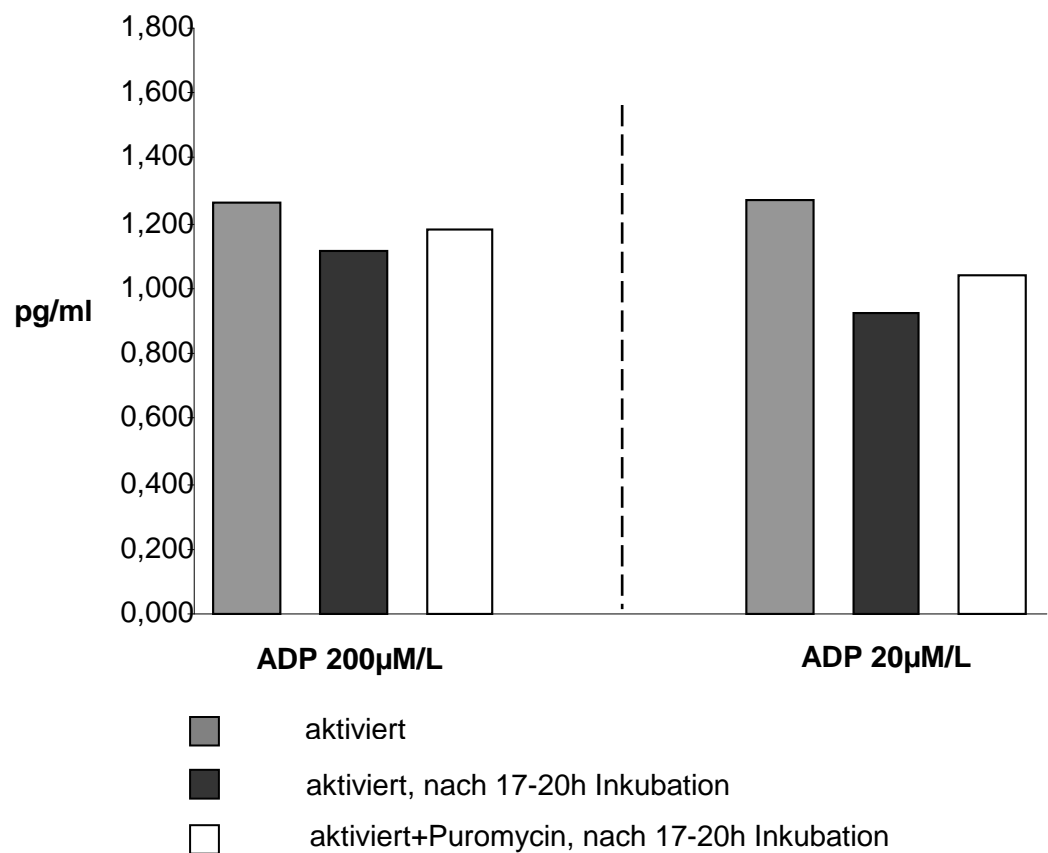


**Abb. 23:** IL-1 $\beta$  Konzentration im thrombozytären Extrakt nach Aktivierung mit Thrombin in der Konzentration von 1 Unit bzw. 0,1 Unit pro  $10^6$  Thrombozyten, mit/ohne Inkubation von 17-20h und mit/ohne Zusatz von Puromycin, nach dreimaliger Depletion der Leukozyten (3xLR). Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (n=2).

Bei der Messung der Konzentrationswerte für IL-1 $\beta$  im Extraktionsüberstand konnte nach Aktivierung mit 1 U/ml Thrombin und Inkubation von 17-20 h keine Konzentrationszunahme festgestellt werden (Abb. 23, links). Die gemessene Konzentration in aktivierten Proben vor Inkubation betrug 1,08 pg/ml und nach Inkubation 1,05 pg/ml. Auch konnte kein wesentlicher Einfluss auf die Konzentration von IL-1 $\beta$  durch Zugabe von Puromycin erzielt werden (0,99 pg/ml). Nach Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin konnten ebenso wenig deutliche Änderungen der Mittelwerte bezüglich der gemessenen Extinktion verzeichnet werden (siehe Abb. 23, rechts). Die IL-1 $\beta$  Konzentration nach Aktivierung betrug

1,17 pg/ml und änderte sich auch nicht entscheidend nach einer Inkubation von 17-20 h (0,91 pg/ml). Unter Zusatz von Puromycin wurde eine IL-1 $\beta$  Konzentration von 0,98 pg/ml gemessen.

Betrachtet man im Vergleich hierzu die erzielten Ergebnisse der Messungen der mit ADP stimulierten Proben, kann man ein ähnliches Ergebnis verzeichnen (siehe Abb 24).



**Abb. 24:** IL-1 $\beta$  Konzentration im thrombozytären Extrakt nach Aktivierung mit 200  $\mu$ M ADP bzw. 20  $\mu$ M pro  $10^6$  Thrombozyten, mit/ohne Inkubation von 17-20h und mit/ohne Zusatz von Puromycin, nach dreimaliger Depletion der Leukozyten (3xLR). Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben (n=2).

Nach Stimulation mit 200  $\mu$ M/L ADP (Abb. 24, links) betrug der gemessene Mittelwert für die aktivierten Proben 1,27 pg/ml. In den zusätzlich inkubierten Proben erhielt man einen Mittelwert von 1,12 pg/ml. Auch nach Zugabe von Puromycin trat keine markante Zunahme der Konzentration von IL-1 $\beta$  auf (1,18 pg/ml). Bei der Aktivierung mit 20  $\mu$ M/L Adenosindiphosphat (Abb. 24, rechts)

konnte eine Konzentration von 1,27 pg/ml IL-1 $\beta$  in aktivierten Proben gemessen werden. Nach einer zusätzlichen Inkubationszeit von 17-20h konnte eine IL-1 $\beta$  Konzentration von 0,93 pg/ml ermittelt werden. In den mit Puromycin versetzten Proben betrug diese 1,04 pg/ml.

Bei der Bestimmung der IL-1 $\beta$  Konzentration im Mediumüberstand der dreifach leukozytenreduzierten Thrombozytenpräparate befanden sich die Messwerte in allen drei Ansätzen - aktiviert und mit zusätzlicher Inkubation mit/ohne Zusatz von Puromycin - unterhalb der Detektionsgrenze von 0,1 pg/ml des verwendeten ELISAs.





---

## 4 DISKUSSION

---

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der so genannten nachhaltigen bzw. längerfristigen Wirkungen von Thrombozyten am Beispiel der Wachstumsfaktoren pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  und VEGF untersucht. Dabei wurden insbesondere die Befähigung von Thrombozyten zur Proteinbiosynthese mittels radioaktiver Markierung und Gelelektrophorese zum allgemeinen Nachweis „neusynthetisierter“ Proteine, sowie der Nachweis ausgewählter Wachstumsfaktoren mittels ELISA durchgeführt. Diese Untersuchungen sind insbesondere für den klinischen Einsatz von Thrombozytenkonzentraten<sup>6,140,141</sup> im Rahmen der Geweberegeneration und Wundheilung relevant.

### 4.1 Bedeutung der thrombozytären Proteinbiosynthese für die Wundheilung

Thrombozyten sind wesentlich an den unmittelbar nach Gewebs- und Gefäßverletzung einsetzenden Prozessen der primären und sekundären Hämostase beteiligt. Durch die Freisetzung der gespeicherten Mediatoren, wie z.B. Zytokine, chemotaktische Proteine und Wachstumsfaktoren, übernehmen aktivierte Thrombozyten wichtige Funktionen bei den folgenden Prozessen der Inflammation<sup>138,139,156,162,271</sup> und Wundheilung.<sup>39,46,61,98,257</sup> Da es sich dabei um einen einmaligen Vorgang handelt, ist die so genannte nachhaltige Wirkung der Thrombozyten in diesem Zusammenhang noch unklar.<sup>61</sup> Viel diskutiert ist dabei die Frage, ob Thrombozyten nach Aktivierung und Immobilisierung im Thrombus in der Lage sind, eine *de novo* Proteinsynthese zu betreiben, da diese die Grundlage für die anhaltenden thrombozytären Wirkungen bilden könnte. In den letzten Jahren konnte in mehreren Studien gezeigt werden<sup>102,134,228</sup>, dass dies auf Ebene und Basis ihrer vorhandenen Gentranskripte möglich ist. Dabei schien vor allem die regulierte Synthese von IL-1 $\beta$  die Bedeutung der Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen zu beweisen.<sup>154</sup> In einigen Studien

gelang es sogar, die Regulationsmechanismen auf Ebene der Translationsinitiationsfaktoren darzustellen.<sup>155,198,222,270</sup>

#### 4.2. Stimulation der Thrombozyten

In den von uns durchgeführten Versuchen erfolgte die Stimulation der Thrombozyten hauptsächlich mit Thrombin, da Thrombin sowohl *in vivo*<sup>68</sup> als auch *in vitro*<sup>48</sup> ein hochpotenter Thrombozytenaktivator ist. Die Aktivierung der Thrombozyten kann jedoch auch durch eine Vielzahl anderer physiologischer Stimulanzien wie ADP, Kollagen, Thromboxan A<sub>2</sub>, Epinephrin und PAF erfolgen. Die intrazelluläre Signalkaskade - in deren Folge es zur Entstehung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) kommt - wird hauptsächlich durch G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren vermittelt.<sup>214,286</sup> Im Falle von Thrombin handelt es sich dabei um so genannte *cell-surface protease-activated receptors* (PARs).<sup>252</sup> Bis heute wurden vier verschiedene PARs identifiziert und charakterisiert, von denen drei (PAR 1, PAR 3 und PAR 4) als Substrate für Thrombin fungieren.<sup>252</sup> Auf humanen Thrombozyten sind hauptsächlich PAR 1 in einer Anzahl von 1500 – 2000 Rezeptoren pro Thrombozyt und ca. 70 % sind auf der Plasmamembran lokalisiert und PAR 4 zu finden, PAR 3 dagegen nur in geringer Anzahl. Wobei PAR 1 zehnmal sensitiver auf Thrombin reagiert als PAR 4. Des Weiteren existiert auf Thrombozyten ein weiterer Thrombinrezeptor, dabei handelt es sich um einen Glykoproteinrezeptor (GPIb-IX), der mit einer Anzahl von 25000 pro Thrombozyt vorkommt.<sup>252</sup> Das wie oben bereits erwähnt entstandene IP<sub>3</sub> führt zur Freisetzung des Ca<sup>2+</sup> aus dem DTS, welches ebenso wie DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C führt. Im Anschluß erfolgt die Aktivierung der Tyrosinkinasen, MAP-Kinasen und Integrine durch Kalzium. Die Induktion der energieabhängigen Exozytose erfolgt im Zusammenspiel von Proteinkinase C und Ca<sup>2+</sup>.<sup>214</sup> Die Sekretion der  $\alpha$ -Granula erfolgt durch alle der oben genannten Agonisten, während die Sekretion der *dense granules* bzw. Lysosomen eines potenten Agonisten wie Thrombin bedarf. In einer Studie von Wuthrich et al.<sup>280</sup> konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> 90 % der Sekretion nach Thrombinstimulation innerhalb von 6-7 s mit einer Verzögerung von 1,5 s stattfinden. Auf zellulärer Ebene erfolgt nach Aktivierung

vierung der Thrombozyten neben der bereits in Abb. 8, Kapitel 1.2.1 gezeigten Veränderung des Zytoskelettes und damit der Änderung der Plättchenmorphologie auch die Zentralisation der  $\alpha$ -Granula, während die *dense granules* in der Peripherie verbleiben. Im Anschluß konfluieren die  $\alpha$ -Granula entweder direkt mit dem OCS oder es konfluieren zunächst die einzelnen Granula miteinander und im zweiten Schritt dann mit dem OCS oder der Plasmamembran. Es wird angenommen, dass die Freisetzung der *dense granules* über eine Interaktion mit der Plasmamembran erfolgt.<sup>215</sup>

Thrombin beeinflusst, neben seiner Hauptaufgabe, welche in der Regulation der Gerinnungskaskade besteht, eine Vielzahl von an thrombozytären Prozessen beteiligten Zellen. Die Aktivierung von Endothelzellen führt so zur Synthese von Prostaglandin  $I_2$ <sup>267</sup>, PAF (*platelet activating factor*)<sup>37,210</sup>, PAI-1 (*plasminogen inhibiting factor*)<sup>281</sup> und weitere durch eben diese. Des Weiteren wird vWF freigesetzt und P-Selectin<sup>107,287,288</sup> exprimiert, woraus eine Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an der Endothelzelloberfläche führt. Eine vermehrte Stickoxidproduktion führt zur Vasodilatation der Gefäße, zudem ändern die Endothelzellen ihre Gestalt und erhöhen ihre Permeabilität, was zu einer Durchlässigkeit für Proteine und zu Ödemen führt.<sup>158</sup> Thrombin wirkt außerdem im Rahmen der Inflammation chemotaktisch auf Monozyten, aktiviert neutrophile Granulozyten und bewirkt in Leukozyten eine Zytokinproduktion.<sup>8,18,60,287,288</sup> Zudem sind weitere Thrombinwirkungen an Geweben, welche nicht im direkten Zusammenhang mit der Hämostase stehen, beschrieben, so z.B. die Wachstumsregulation von Neuronen und glatten Muskelzellen, sowie deren Kontraktion, die Proliferation von Tumorzellen und Bildung von Tumormetastasen.<sup>186</sup> In Thrombozyten führt Thrombin nicht nur zur Degranulation und Aggregation, sondern induziert auch die Expression von P-Selectin und CD 40<sup>111</sup> auf der Thrombozytenoberfläche und führt zur Aktivierung von GP IIb-IIIa.<sup>230</sup>

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.3.1 Nachweis der *de novo* Proteinsynthese in Thrombozyten mittels radioaktiver Proteinmarkierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein genereller Nachweis der Neusynthese von Proteinen in Thrombozyten angestrebt. Im Besonderen haben wir dabei unser Augenmerk zum einen auf die Frage gerichtet, in wieweit eine Stimulation der Thrombozyten, hier mittels Thrombin geschehen, entscheidend ist; und zum anderen, wie groß der Einfluss durch kontaminierende Leukozyten ist. Unter Anwendung von radioaktiver Proteinmarkierung und 2D- bzw. 1D-Protein-gelanalyse stand in unseren Experimenten die Aktivität der Proteinsynthese stets im direkten Zusammenhang mit der Anzahl kontaminierender Leukozyten. In den bereits genannten publizierten Studien waren alle verwendeten Thrombozytenpräparationen deutlich mit Leukozyten kontaminiert. Gemäß den Angaben der Autoren waren  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Leukozyten in einer Suspension von  $10^9$  Thrombozyten enthalten.<sup>155,198,222</sup> Ähnlich starke Kontaminationen von  $4 \times 10^5$  Leukozyten in  $10^8$  Thrombozyten führten in unseren Experimenten zu deutlich positiven Ergebnissen der Proteinmarkierung. Nach Reduzierung der Leukozytenzahl auf ca. 100-200 in  $10^8$  Thrombozyten war der Einbau der radioaktiven Aminosäure nicht mehr nachweisbar, durch Zugabe von Thrombin konnten keine Veränderungen beobachtet werden (s. Abb 16, links und Abb. 17, links). Unterschiede im radioaktiven Muster der Thrombozytenkonzentrate mit einem hohen Gehalt an Leukozyten nach Stimulation mit Thrombin, vgl. Abb. 16, rechts mit Abb. 17, rechts, entstehen vermutlich infolge der nachgewiesenen Anregung der Synthese von z.B. Zytokinen in Leukozyten durch Thrombin.<sup>8,18,60</sup> Im zweiten Versuch wurde die Proteinbiosyntheseaktivität sowohl im Medium, in dem die Thrombozyten suspendiert waren, als auch nach Lyse der Thrombozyten im Extraktionsüberstand bestimmt. Lediglich in den Proben mit einer Leukozytenkontamination von  $10^6$  Leukozyten bei  $10^8$  Thrombozyten konnte im Extraktionsüberstand eine Proteinbiosyntheseaktivität nachgewiesen werden. In den Proben mit einer reduzierten Leukozytenzahl von lediglich  $10^3$  bzw. 100-200 Leukozyten in  $10^8$  Thrombozyten war der Einbau der radioaktiven Aminosäure wiederum nicht nachweisbar.

Der Nachweis von *de novo* Proteinbiosynthese mittels radioaktiver Proteinmarkierung hat somit gezeigt, dass die Biosyntheseaktivität deutlich mit dem Maß der Leukozytenkontamination korreliert. Die Vermutung liegt nahe, dass die *de novo* Synthese von Proteinen, in den kontaminierenden Leukozyten, also nicht in den Thrombozyten selbst stattfindet. Offen bleibt in unserem Versuch die Frage, ob neben der Thrombin-Aktivierung möglicherweise andere Mechanismen die *de novo* Proteinsynthese in Thrombozyten auslösen können. Entsprechende Untersuchungen unter Verwendung von ADP, Epinephrin, PAF (*platelet activating factor*) oder Kollagen<sup>154</sup> können zur Klärung dieser Frage beitragen.

#### 4.3.2 Nachweis der *de novo* Synthese von pro IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ und VEGF in Thrombozyten

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem spezifischen Nachweis der Neusynthese der Interleukine pro IL-1 $\beta$  und IL-1 $\beta$ <sup>154</sup> bzw. des Wachstumsfaktors VEGF<sup>16,78</sup>. Die Auswahl der Wachstumsfaktoren erfolgte aufgrund ihrer wesentlichen Rolle im Rahmen von inflammatorischen Prozessen und ihrer entscheidenden Funktion in der Wundheilung. Nachweislich werden IL-1 $\beta$  und VEGF in der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert, wie in Kapitel 1.1.3, Tabelle 2 bereits dargestellt wurde. In einer bereits publizierten Studie<sup>154</sup> konnte zudem die regulierte Synthese von pro IL-1 $\beta$  bzw. IL-1 $\beta$  gezeigt werden. In anderen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass Gentranskripte von IL-1 $\beta$  in Thrombozyten nicht nachweisbar sind<sup>34,35</sup>.

Ein zentrales Ziel unserer Untersuchungen war der Nachweis einer Neusynthese der genannten Wachstumsfaktoren nach nahezu vollständiger Elimination der Leukozyten aus den Thrombozytenpräparaten. Dazu wurden drei verschiedene Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Leukozytenkontamination (LR 0 mit  $74,8 \pm 23,3$  Leukozyten pro  $10^6$  Thrombozyten; LR 1 mit  $0,6 \pm 0,47$  Leukozyten pro  $10^6$  Thrombozyten; LR 3 mit  $0,34 \pm 0,47$  Leukozyten pro  $10^6$  Thrombozyten) eingesetzt.

Wie bereits in der Einleitung in Kap. 1.3 beschrieben, ist für pro IL-1 $\beta$  bekannt, dass es sich dabei um den Vorläufer von IL-1 $\beta$  - ohne eigene IL-1 $\beta$  Bioaktivität - handelt. Eine Freisetzung erfolgt fast ausschließlich erst nach Überführung in

seine aktive Form „IL-1 $\beta$ “ aus dem Zytosol einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und aus diversen Geweben.<sup>55,58,154</sup> Es ist bekannt, dass neben bakteriellem Endotoxin auch Thrombin ein wesentlicher Stimulus für seine Transkription ist.<sup>58</sup> Die Messung von pro IL-1 $\beta$  in den Proben aus dem thrombozytären Extrakt zeigten in Anwesenheit von Leukozyten einen hochsignifikanten ( $p=0,000$ ) Anstieg der Konzentration 17-20 Stunden nach der Aktivierung mit Thrombin. Unter Zugabe des Translationshemmers Puromycin kam es zur vollständigen Unterdrückung der stimulierten pro IL-1 $\beta$  Synthese. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass es sich um eine Neubildung von pro IL-1 $\beta$  im Sinne der Proteinbiosynthese handelt. Im Gegensatz zu der 2001 von Lindemann et al.<sup>154</sup> veröffentlichten Studie konnte nach nahezu vollständiger Elimination der Leukozyten aus der Präparation keine Zunahme der pro IL-1 $\beta$  Konzentration mehr verzeichnet werden, vgl. Abb. 20. Erwartungsgemäß ergaben die Bestimmungen der Konzentration von IL-1 $\beta$ , sowohl im thrombozytären Extrakt, als auch im Mediumüberstand ein vergleichbares Ergebnis. Eigene Messungen von IL-1 $\beta$  vor Aktivierung der Proben ergaben eine Konzentration von etwa 4 pg/ml in  $10^6$  Thrombozyten. Da es sich dabei um eine relativ geringe Konzentration handelt, wurde zur Bestimmung der Konzentration ein sogenannter „*high sensitivity*“ ELISA, mit einer Sensitivität von 0,1 pg/ml bis zu einem Maximalwert von 8 pg/ml, eingesetzt, um zuverlässige Ergebnisse in diesem niedrigen Konzentrationsbereich zu gewährleisten. Ein signifikanter Anstieg der Konzentration von IL-1 $\beta$  erfolgte nur bei einer relativ hohen Kontamination der Thrombozytenpräparate mit Leukozyten. Dieser war durch Zugabe von Puromycin im Thrombozytenextrakt vollständig aufzuheben (Abb. 21 und 22). Der signifikante Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration im Mediumüberstand, zum einen trotz Zugabe von Puromycin, zum anderen nach Leukozytendepletion, ist dadurch zu erklären, dass eine Freisetzung aus den Zellen in das umgebende Medium erfolgt sein muss (Abb. 23).<sup>58</sup> Stützend für diese These war, dass die Konzentration auch in Anwesenheit des Translationsinhibitors Puromycin anstieg. Es ist zu vermuten, dass es sich lediglich bei den Präparationen ohne weitere Leukozytendepletion um Neusynthese von pro IL-1 $\beta$  durch Leukozyten handelt, da erwiesen ist, dass sowohl Thrombin als Stimulans der Zytokinproduktion in Leukozyten fungiert<sup>8,18,60,287,288</sup>, als auch die Bindung der Thrombozyten nach

Aktivierung an Leukozyten in diesen eine Induktion der Zytokinsynthese bewirkt.<sup>185,269</sup> Nach Depletion der Leukozyten hingegen war kein Anstieg der Konzentration von IL-1 $\beta$  in den inkubierten Proben zu messen. Es gelang unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht, nach Stimulation mit Thrombin und nach erfolgter, nahezu vollständiger Depletion der Leukozyten in den vorliegenden Thrombozytenpräparationen einen Hinweis auf eine von den Thrombozyten ausgehende *de novo* Synthese von pro IL-1 $\beta$  bzw. IL-1 $\beta$  zu erhalten.

VEGF spielt, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, sowohl in der physiologischen, als auch in der pathologischen Angiogenese und der Inflammation eine erhebliche Rolle. Die dominierende Isoform VEGF<sub>165</sub> wird von einer Vielzahl von Zellen (Monozyten, Makophagen, Mastzellen), Tumorzellen, sowie in fast allen Geweben (Milz, Leber, Niere, Gehirn) gebildet und wird zudem in der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert. Es gelang bereits, wie Studien von Möhle et al.<sup>182</sup> bzw. Bugert et al.<sup>34</sup>, zeigen, VEGF<sub>165</sub> mRNA sowohl in Megakaryozyten, als auch in peripheren Blutzellen - insbesondere in Thrombozyten – nachzuweisen. Zudem konnte in Studien von Wartiovaara et al.<sup>263</sup> und Möhle et al.<sup>182</sup> gezeigt werden, dass Thrombozyten VEGF speichern und innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation mit Thrombin VEGF freisetzen. Wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, konnte eine Synthese von VEGF in den durchgeführten Versuchen wiederum nur in Anwesenheit von Restleukozyten in den Thrombozytenkonzentraten, nach Stimulation mit Thrombin bzw. durch Interaktionen mit aktivierten Thrombozyten und Monozyten infolge der Thrombinstimulation, gezeigt werden. In den Proben nach Depletion der Leukozyten konnte, bei einer ELISA-Sensitivität von 5 pg/ml, kein Nachweis einer Neusynthese von VEGF durch Thrombozyten erbracht werden. Zu diskutieren ist hier sicherlich, ob die gewählte Nachweismethodik sensitiv genug ist und ob davon auszugehen ist, dass eine eventuelle Neusynthese von VEGF durch Thrombozyten in einem geringeren Konzentrationsbereich zu erwarten wäre.

#### 4.3.2 Thrombozytenstimulation mit Thrombin und ADP

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob die zur Aktivierung eingesetzte Dosis von Thrombin bzw. ADP einen Einfluss auf die Synthese von IL-1 $\beta$  durch Thrombozyten in Leukozyten-depletierten Proben hat. Von besonderem Interesse war zudem, ob die Aktivierung der Thrombozyten mit ADP über andere Rezeptoren als Thrombin, einen Stimulus für die Proteinsynthese in Thrombozyten darstellt.

Wie in Kapitel 3.2.4 und Abb. 24 dargestellt, konnte jedoch kein Einfluss der eingesetzten Thrombindosis geltend gemacht werden. Es war auch in diesem Versuch weder durch eine Aktivierung mit 0,1 Unit noch mit 1 Unit Thrombin pro  $10^6$  Thrombozyten ein Hinweis für eine IL-1 $\beta$  Neusynthese zu erbringen.

Bei ADP handelt es sich, ähnlich wie bei Thrombin, um einen potenten Thrombozytenagonisten. ADP wird sowohl von beschädigtem Gefäßendothel, als auch von Erythrozyten oder auch den aktivierten Thrombozyten selbst aus den *dense granules* freigesetzt.<sup>85</sup> Auf Thrombozyten existieren zwei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für ADP. Zum einen P2Y<sub>1</sub>, durch ihn erfolgt eine Aktivierung der Phospholipase C und die Mobilisierung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>. Er übernimmt somit eine entscheidende Vermittlerrolle bei der Änderung der Oberflächenmorphologie und der Aggregation der Thrombozyten.<sup>126</sup> Zum anderen P2Y<sub>AC</sub>/P2 - auch als P2Y<sub>12</sub> bezeichnet - welcher die Adenylatcyclase inhibiert, um die cAMP Synthese zu unterbinden.<sup>115</sup> Nach Aktivierung der Thrombozyten mit 200  $\mu$ M/L bzw. 20  $\mu$ M/L ADP war im extrahierten Zellpellet nach Inkubation von 17-20 Stunden kein Anstieg der Konzentration von IL-1 $\beta$  zu beobachten. Die Messungen von IL-1 $\beta$  im Mediumüberstand befanden sich, wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt, unterhalb des ELISA-Messbereichs von 0,1 pg/ml. Es ist davon auszugehen, dass sowohl nach Stimulation mit Thrombin, als auch mit ADP in unterschiedlicher Konzentration keine Produkte einer *de novo* Synthese durch Thrombozyten im Thrombozytenpellet bzw. Mediumüberstand entstanden sind.

Auf der Grundlage der erhobenen Daten können wir eine direkte Proteinbiosynthese in Thrombozyten ausschliessen. Dies konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden. So steht die Synthese von Zytokinen in Thrombozytenkonzentraten im direkten Zusammenhang mit der Leukozytenkontamination.<sup>152</sup>



Dass es sich um eine *de novo* Synthese handelte, konnte durch die Anwendung von Actinomycin als Transkriptionsinhibitor nach LPS-Stimulation bewiesen werden.<sup>152</sup> Des Weiteren hat sich gezeigt, dass auch die Verfahren zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten (TKs) einen Einfluss auf die Leukozytenkontamination und die Zytokinsynthese während der Lagerung der Präparate haben. So sind nach der PRP (plättchenreiches Plasma) – Methode höhere Leukozytenzahlen im TK zu finden als bei der *buffy-coat-pool* - Methode, und ein Anstieg des Zytokingehaltes ist nur im PRP-TK zu finden.<sup>6,78,140,141</sup>

Die Neusynthese von Faktoren durch Thrombozyten erscheint anhand der vorliegenden Studienergebnisse als nicht wahrscheinlich. Es ist nicht davon auszugehen, dass durch Aktivierung der Blutplättchen eine Bereitstellung von Faktoren, die chemotaktisch und mitotisch aktiv sind, durch Proteinbiosynthese erfolgt. Die von uns diskutierte Möglichkeit, dass diese Neusynthese Grundlage der längerfristigen Wirkung von Thrombozyten im Rahmen der Inflammation und Wundheilung ist, kann somit nicht bestätigt werden. Es ist zu vermuten, dass die Wirkung der Thrombozyten bei Prozessen der akuten Inflammation nach Ausschüttung der chemotaktischen und regenerationsfördernden Faktoren hauptsächlich auf der Immobilisierung inflammatorischer Effektorzellen beruht. Die nachhaltige Bereitstellung von Faktoren, wie sie im Rahmen der Wundheilung beim Einsatz von Thrombozytenpräparaten diskutiert wird, erfolgt offensichtlich nicht direkt durch die Thrombozyten, sondern könnte durch die Interaktion mit Effektorzellen (Neutrophile, Monozyten etc.) reguliert werden. Erwiesenermaßen können mit Thrombin aktivierte Plättchen durch Adhäsion an Monozyten oder neutrophilen Granulozyten die Synthese von IL-1 $\beta$ , IL-8 und MCP-1 induzieren.<sup>185</sup>

#### 4.4 Fazit und Ausblick

Wie die Ergebnisse der Untersuchungen gezeigt haben, konnte mittels der hier angewandten Methoden keine *de novo* Proteinsynthese von Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren in Thrombozyten von adulten, gesunden Spendern verschiedener Blutgruppen, unterschiedlichen Alters und Geschlechts nachgewiesen werden.

Bei einer Fortführung dieser Arbeit sollten weitere Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen besteht die Überlegung, ein Verfahren wie z.B. die Durchflusszytometrie zu nutzen, um die Sensitivität der Versuche, insbesondere der Messungen auch sehr geringer Mengen an VEGF, zu erhöhen. Zum anderen sollten weitere Variationen der Stimulation, beispielsweise mit ADP in Kombination mit Epinephrin, Kollagen, usw., berücksichtigt werden, oder auch der Einsatz eines Modells, in dem Thrombozyten z.B. an eine Fibrinogen-beschichtete Matrix bzw. aktivierte Endothelzellen bei einem konstanten „Blutfluss“ adhären, in Betracht gezogen werden. So könnte man weitgehend *in vivo* Verhältnisse simulieren. Des Weiteren wären Untersuchungen von besonderem Interesse, die Thrombozyten unterschiedlichen „Alters“ berücksichtigen. Eine vergleichende Studie zwischen „normal gesunden“ Spendern und Patienten mit einer gesteigerten Thrombozytensynthese bei verkürzter Thrombozytenlebensdauer, wie es bei ITP-Patienten (idiopathische thrombozytopenische Purpura)<sup>91,217</sup> der Fall ist, wäre aufschlussreich. Denkbar wären zum Vergleich auch Untersuchungen bei normal gesunden Blutspendern 1-2 Tage nach erfolgter Thrombozytenapherese.<sup>130</sup>

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Thrombozyten werden auch Blutplättchen genannt und sind die kleinsten zellulären, kernlosen Bestandteile des Blutes. Neben ihrer Hauptfunktion bei der primären und sekundären Hämostase haben sie entscheidenden Einfluss auf die sich anschließende Wundheilung. Infolge einer Gefäßverletzung entsteht im Zusammenspiel von Thrombozytenaggregation und Gerinnungskaskade ein Thrombus, um einen möglichst raschen Gefäßverschluss zu erzielen; dabei erfolgt die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Durch die Ausbildung von Pseudopodien vergrößern sie ihre Oberfläche zur Präsentation von Zelladhäsionsrezeptoren. Des Weiteren kommt es im Rahmen der Aktivierung zur Degranulation, d.h. zur Freisetzung der Mediatoren aus den Speichergranula. Auch bei den während der Gefäßverletzung initiierten Prozessen der akuten Inflammation mit dem Ziel einer unspezifischen Immunabwehr, sowie der Gefäß- bzw. Geweberegeneration, übernehmen Thrombozyten wichtige Aufgaben: Die während der Aktivierung freigesetzten Mediatoren haben nachweislich chemotaktische, mitogene und auch antibakterielle Wirkungen. So werden inflammatorische Effektorzellen in das geschädigte Gewebe gelockt und durch Zelladhäsionsrezeptoren an der Thrombozytenoberfläche immobilisiert. Bis jetzt noch ungeklärt ist, ob Thrombozyten darüber hinaus Wachstumsmediatoren bzw. Mediatoren generell durch *de novo* Proteinsynthese zum Erhalt langfristiger Wirkungen bereitstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Aspekt der *de novo* Proteinbiosynthese in Thrombozyten näher untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Verfahren des Nachweises einer Proteinsynthese gewählt: Die radioaktive Proteinmarkierung und Proteingelanalyse dienen dem allgemeinen Nachweis neu gebildeter Proteine. Hierzu wurden leukozytendepletierte Thrombozyten in Anwesenheit einer radioaktiv markierten Aminosäure ( $^{35}\text{S}$ -Methionin) mit und ohne Agonist (Thrombin oder ADP) inkubiert. Den Vergleichsansätzen wurden autologe Leukozyten hinzugefügt. Mittels 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteinextrakte aus den Ansätzen. Durch eine im

Anschluß folgende Autoradiographie konnten die radioaktiv markierten, aus der *de novo* Proteinbiosynthese entstandenen Proteine sichtbar gemacht werden. Positive Ergebnisse im Sinne eines radioaktiven Proteins konnten bei diesen Untersuchungen nur dann erzielt werden, wenn eine Kontamination durch Leukozyten vorlag.

Der spezifische Nachweis von Wachstumsfaktoren, die für die Wundheilung relevant sind (IL-1 $\beta$ , pro IL-1 $\beta$  und VEGF), erfolgte mittels ELISA. Dazu wurden die Thrombozytenpräparate mit und ohne Kontamination durch Leukozyten mittels Thrombin bzw. ADP stimuliert und anschließend noch 17-20h in Zellkulturmedium inkubiert. Die Messungen der Proteinkonzentrationen erfolgten vor und nach Inkubation. Des Weiteren wurde einem Vergleichsansatz Puromycin als Translationshemmer beigelegt. Auch dieser spezifische und quantitative Ansatz zum Nachweis von *de novo* Proteinsynthese führte nur dann zum positiven Ergebnis (= Anstieg der Proteinkonzentration), wenn eine Kontamination mit Leukozyten vorlag.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ist eine *de novo* Proteinbiosynthese und damit die nachhaltige Bereitstellung von Mediatoren durch aktivierte Thrombozyten über die einmalige Freisetzung hinaus unwahrscheinlich. Der Widerspruch zu der in der Fachliteratur beschriebenen Proteinbiosynthese in Thrombozyten könnte durch die unterschiedlichen Präparations- und Aufreinigungsverfahren begründet sein. Das Ausmaß der Leukozytenkontamination scheint hierbei einen entscheidenden Faktor darzustellen.

---

## 6 SUMMARY

---

Thrombocytes, or blood platelets, are the smallest cellular anuclear constituents of the blood. Apart from their main function of being involved in the cellular mechanism of primary and secondary hemostasis, they play a decisive role in subsequent wound healing. Once a blood vessel is injured, thrombocyte aggregation and coagulation cascading lead to the formation of a thrombus in order to repair the damaged vessel quickly. Thrombocytes are activated and aggregated. By forming pseudopodia, they extend their surface area to present cell adhesion receptors. Activation also leads to degranulation, that is, the release of mediators from storage granules. Thrombocytes also play an important role in the acute inflammation processes initiated by vessel damage (aiming at a non-specific immune response), as well as vessel- and tissue regeneration. The mediators released during activation have demonstrable chemotactic, mitogenic, and antibacterial effects. Inflammatory effects cells are lured into the damaged tissue and are immobilized by cell adhesion receptors on the thrombocyte's surface. Until now, it is not clear whether thrombocytes also provide growth or other mediators through de novo protein synthesis to maintain long-term effects.

The paper presented here concerns an investigation of de novo protein synthesis in thrombocytes. To do this, two different processes for identifying protein synthesis were used. Radioactive protein markers and protein gel analysis are generally used to identify newly-created proteins. Leucocyte-depleted thrombocytes were incubated in the presence of a radioactively-marked amino acid ( $^{35}\text{S}$ -methionine), both with and without an agonist (thrombin or ADP). In a parallel test series, autologous leucocytes were added. Protein extracts were separated from each test series by means of 1-D and 2-D gel electrophoresis. Subsequent autoradiography was used to make visible the radioactively-marked proteins resulting from de novo protein biosynthesis. Positive results, in

the sense of a radioactive protein, could only be achieved if there was leucocyte contamination.

Specific proof of growth factors relevant to wound healing (IL-1 $\beta$ , pro IL1 $\beta$ , and VEGF) was determined by ELISA. For this purpose, the thrombocyte preparations, both contaminated and uncontaminated by leucocytes, were stimulated with thrombin or ADP and then incubated in a cell culture medium for 17-20 hours. Protein concentrations were measured before and after incubation. Additionally, puromycin was added to one test series as a translation inhibitor. This specific and quantitative approach to identifying de novo protein synthesis also led to a positive result (increased protein concentration) only if contaminated by leucocytes.

The data in this paper indicates that de novo protein synthesis, and hence the sustained provision of mediators by activated thrombocytes, is improbable after one-time release. This contradiction to protein biosynthesis in thrombocytes described in technical literature may be due to the different preparation- and purification procedures used. The extent of leucocyte contamination appears to play a decisive role in this case.

---

## 7 LITERATUR

---

1. Adams DH, Hathawy M, Shaw J, Burnett D, Elias E, Strin AJ. Transforming growth factor beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J Immunol* 1991;147: 609-612
2. André P, Denis CV, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000;96:3322-3328.
3. Andrews RK, Lópes JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem* 1997;29:91-105.
4. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Berndt MC. Platelet adhesion receptors and (patho)physiological thrombus formation. *Histol Histopathol* 2001;16:969-990.
5. Atkins E. Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 1960;40:580-646.
6. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1995;35:117-124.
7. Bahou WF, Gnatenko DV. Platelet transcriptome: the application of microarray analysis to platelets. *Semin Thromb Haemost* 2004;30:473-484.
8. Bar-Shavit R, Kahn A, Wilner GD, Fenton JW. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science* 1983;220:728-731.
9. Bates DO, Pritchard Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2003; 2:107-120.
10. Baumgartner HR. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium. *Jpn Heart J* 1977;37:323-335.
11. Becker RP and De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976;145:183-205.
12. Beckstead JH, Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Bainton DF. Immunohistochemical localization of membrane and alpha-granule proteins in human megakaryocytes: application to plastic-embedded bone marrow biopsy specimens. *Blood* 1986;67:285-293.
13. Behnke O and Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 1998;61:3-23.

14. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000; 86:E29-E35.
15. Ben Ezra J, Sheibani K, Hwang DL, Lev-Ran A. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol* 1990;137:755-759.
16. Berger G, Caen J-P, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood* 1993;82:3034-3044.
17. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 1998;92:4446-4452.
18. Bizios R, Lai L, Fenton J, Malik AB. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986;128:485-490.
19. Bizzozero J. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virch Arch Path Anat Physiol Klin Med* 1882;90:261-332.
20. Booyse FM, Rafelson ME jr. Studies on human platelets. I. Synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 1968;166:689-697.
21. Booyse FM, Rafelson ME jr. Human platelet contractile proteins: location, properties and function. *Ser Haemat* 1971;5:152-174.
22. Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslee D, Capron A. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* 1986;231:153-156.
23. Boyles J, Fox JEB, Phillips DR, Stenberg PE. Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J Cell Biol* 1985;101:1463-1472.
24. Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signaling through G-proteins and G-protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;70:217-223.
25. Brass LF, Molino M. Protease activated G-proteins-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997;78:234-241.
26. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* 2004; 104:3943-3948.
27. Brouhard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes and coagulation. *Hematol* 2001;8: 263-269.
28. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:1521-1524.



29. Brown L, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Walter L. Expression of VPF/VEGF by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176:1375-1379.
30. Bruce IJ, Kerry R. The effect of chloramphenicol and cycloheximide on platelet aggregation and protein synthesis. *Biochem Pharmacol* 1987;36:1769-1773.
31. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Klüter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996;36:445-449.
32. Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kasco-Vilbois MH, Humphrey PPA. Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood* 1982;92:3521-3528.
33. Bugert P. Die Rolle von Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen. Habilitationsschrift für das Fach klinische Molekularbiologie, Fachbereich Humanmedizin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
34. Bugert P, Dugrillon A, Günaydin A, Eichler H, Klüter H. Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization. *Thromb Haemost* 2003;90:738-748.
35. Bugert P, Lösel R, Dugrillon A, Günaydin A, Eichler H, Wehling M, Klüter H. Gene transcripts in platelets: just 'junk' RNA or prerequisites for *de novo* protein biosynthesis. Proceedings of the 17th Meeting of the International Society of Haematology (European & African Division ISH-EAD), Linkesch W (Editor), Monduzzi Editore S.p.A. Bologna/Italy, S. 9-14 (2003).
36. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
37. Carveth H, Shaddy R, Whatley R McIntyre T, Prescott S, Zimmermann G. Regulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and PAF-mediated neutrophil adhesion to endothelial cells activated by thrombin. *Sem Thromb Hemost* 1992;18:126-134.
38. Chatterjee D, Anderson GM. The human platelet dense granule: serotonin uptake, tetrabenazine binding, phospholipid and ganglioside profiles. *Arch Biochem Biophys* 1993;302:439-446.
39. Choi BH, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:56-59
40. Christensen LL, Grunnet N, Rüdiger N. Comparison of the level of cytokine mRNA in buffy coat-derived platelet concentrates prepared with or without white cell reduction by filtration. *Transfusion* 1998;38:236-241.
41. Clementson KJ and Clementson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001;86:189-197.
42. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley B, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM and Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470-78.
43. Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y. Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 1987;70:177-185.

44. Corral, et al. VEGF is more important than basic fibroblastic growth factors during ischemic wound healing. *Arch Surg* 1999;134:200-205.
45. Cramer EM. Megakaryocyte structure and function. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 354-361.
46. Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanat Moroni M, Carabelli A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apheresis Sci* 2004;30:145-151.
47. Dangelmaier CA and Holmsen H. Determination of acid hydrolases in human platelets. *Anal Biochem* 1980;104:182-191.
48. Davey M and Luscher E. Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature* 1967;216:857-858.
49. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *Faseb J* 2000;14:1265-1278.
50. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmermann GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 2005;122:379-91.
51. Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnet NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:C1429-C1452.
52. Deuel TF. Protein granule factors. In: von Bruchhausen F., Walter U, eds. *Platelets and their Factors*. Springer: New York 1997:247-296.
53. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4584-4587.
54. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-1652.
55. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1998;856:1-11.
56. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-508.
57. Dinarello CA. Interleukin-1 family (IL-1F1, F2). In: Thomson AW, Lotze MT, eds. *The Cytokine Handbook*, 4<sup>th</sup> Ed. Academic Press (Elsevier Science): New York 2003:643-668.
58. Dinarello CA. IL-1 $\beta$ . *Critical Care Medicine* 2005;33:460-2.
59. Donné A. De l'origine des globule du sang, de leur mode de formation et leur fin. *CR Acad Sci* 1842;14:366.
60. Drake W and Issekut A. A role for  $\alpha$ -thrombin in polymorphonuclear leukocyte recruitment during inflammation. *Thromb Haemost* 1992;18:333-340.
61. Dugrillon A, Klüter H. Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Therap Med* 2002;3:21-26.

62. Dvorak AM and Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001;49:419-431.
63. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987;57:673-686.
64. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L and Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:233-235.
65. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvrak AM. VPF/VEGF, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
66. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak A M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132.
67. Ehrlich HP and Gordon JL. Proteinases in platelets. In: Gordon GL, ed. *Platelets in biology and pathology*. Elsevier: Amsterdam/North Holland 1976:132-141.
68. Eidt J, Allison P, Nobel S. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries with endothelial injury. *J Clin Invest* 1989;84:18-27.
69. Eriksson U and Alitalo K. Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:41-57.
70. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999;93:876-85.
71. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial cell growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 1991;47:211-218
72. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4:336-340.
73. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77,527-543.
74. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Harau S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. Extracellular ATP triggers IL-1 $\beta$  release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 1979;159:1451-1458.
75. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Caver-Moore K, de Sauvage FJ. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* 1996;87:2154-2161.

76. Fox J, Reynolds C, Morrow J, Phillips D. Spectrin is associated with membrane bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease during platelet activation. *Blood* 1987;69:537-545.
77. Fox J, Boyles J, Berndt M, Steffen P, Anderson L. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol* 1988;106:1525-1538.
78. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound Hhealing. *J Dent Res* 2005;84:434-439.
79. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7450-7454.
80. Fukami MH. Isolation of dense granules from human platelets. *Methods Enzymol* 1992;25:36-42.
81. Fukami MH. Dense granule factors. In: von Bruchhausen F, Walter U, eds. *Platelets and their Factors*. Springer: New York 1997:419-432.
82. Fukami MH, Holmsen H, Kowalska MH, Niewiarowski S. Platelet secretion. In: Coleman RW, Hirsch J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 4<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia 2001:561-573.
83. Furie B and Furie BC. In vivo thrombus formation. *Thromb Haemost* 2007;5:12-17.
84. Furmann MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone MI, Becker RC, Hechtmann HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulation monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronaryartery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:352-358.
85. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA. Adenosin diphosphate in red cells as a factor in the adhesivness in human blood platelets. *Nature* 1961;192:531-532.
86. Gawaz M. *Blood platelets – physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases*. New York: Thieme 2001:1-56.
87. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cariovasc Res* 2004;61:498-511.
88. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:3378-3384.
89. Gentry PA. The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J Comp Pathol* 1992;107:243-270.
90. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-1539.
91. George JN, Sadler JE, Lämmle B. Platelets: thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematol* 2002;02:315-334.

92. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999;126:1149-1159.
93. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-628.
94. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2311-2315.
95. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* 2003;101:2285-2293.
96. Görg A, Postel W, Günther S, Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on-transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985;6:599-604.
97. Gospodarowicz D, Abraham JA and Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7311-7315.
98. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:529-535.
99. Haller H, Kunzendorf U, Sacherer K, Lindschau C, Walz G, Distler A, Luft FC. T cell adhesion to P-selectin induces tyrosine phosphorylation of pp125 focal adhesion kinase and other substrates. *J Immunol* 1997;158:1061-1067.
100. Handagama PJ, George JN, Shuman MA, McEver RP, Bainton DF. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:861-865.
101. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. The origin of platelet alpha-granule proteins. *Biol Res* 1990;356:119-130.
102. Hartwig D, Härtel C, Müller-Steinhardt M, Schlenke P, Klüter H. Evidence for de novo synthesis of cytokines and chemokines in platelet concentrates. *Vox Sang* 2002; 82:182-190.
103. Hartwig JH and DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol* 1991;112:407-425.
104. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 1992;118:1421-1442.
105. Hartwig JH and Italiano J jr. The birth of the platelet. *Thromb Haemost* 2003; 1:1580-1586.
106. Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 2000;275:23409-23412.

107. Harrison P, Cramer EM. Platelet  $\alpha$ -granules. *Blood Rev* 1993;7:52-62.
108. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sinus PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrandt factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989;264:7768-7771.
109. Hawrylowicz CM, Santoro SA, Platt FM, Unanue ER. Activated platelets express IL-1 $\beta$  activity. *J Immunol* 1989;143:4015-4018.
110. Hellstrand K and Hermodsson S. Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 1987;139:869-875.
111. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
112. Herd CM and Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J* 1994;7:1145-1160.
113. Hirsch JG. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med* 1960;112:15-22.
114. Hofmann WK, Kalina U, Koschmieder S, Seipelt G, Hoelzer D, Ottmann OG. Defective megakaryocytic development in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002;38:13-19.
115. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2000;409:202-207.
116. Holmsen H and Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Ann Rev Med* 1979;30:119-134.
117. Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol* 1985;22:151-163.
118. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001;173:35-43.
119. Ibele GM, Kay NE, Johnson GJ, Jacob HS. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* 1985;65:1252-1255.
120. Italiano JE jr, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the end of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147:1299-1312.
121. Italiano JE jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *Thromb Haemost* 2007;5:18-23.
122. Jackson CAW, Arnold T, Pestina T, Stenberg P. Thrombopoiesis and thrombopoietins: molecular, cellular, preclinical, and clinical biology. In: Kuter DJ, Hunt P, Sheridan W, Zucker-Franklin D, eds. *Megakaryocyte biology*. Humana Press Inc: Totowa; 1997:3-40.

123. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *Thromb Haemost* 2003;1:1602-1612.
124. Jacobson S, Carneskog J, Ridell B, Wadenvik H, Swolin B, Kutti J. Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy in chronic myeloproliferative disorders and reactive thrombocytosis. *Eur J Haematol* 1996;56:287-92.
125. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1996;276:1423-1425.
126. Jin J and Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8070-8074.
127. Joukov V, Pajusola K, Kapainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-98.
128. Kaczmarek E, Lee MH, McDonagh J. Initial interaction between fibrin and tissue plasminogen activator (t-PA). The Gly-Pro-Arg-Pro binding site on fibrin(ogen) is important for t-PA activity. *J Biol Chem* 1993;268:2474-2479.
129. Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992;176:587-592.
130. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive for young and old platelets. *J Clin Invest* 1969;48:1073-1082.
131. Kaufman RM, Airo R, Pollack S, Crosby HW. Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood* 1965;26:720-731.
132. Kehrel B, Wierwille S, Clementson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ. Glykoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen whereas CD36 glykoprotein IIb/IIIa and von Willebrandt factor do not. *Blood* 1998;91:491-499.
133. Kenney D and Linck R. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J Cell Sci* 1985;78:1-22.
134. Kieffer N, Guichard J, Farcet J-P, Vainchenker W, Breton-Gorius J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 1987;164:189-195.
135. Klinger MH, Klüter H. Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle-mediated transport of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. *Cell Tissue Res* 1995;279:453-457.
136. Klinger MH. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Ann Hematol* 1996;73:103-112.
137. Klinger MHF. Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 1997;196:1-11.

138. Klinger MHF. Inflammation. In: Michelsen AD, ed. Platelets. Academic Press: New York;2002;31:459-464.
139. Klinger MH, Jelkmann W. Role of platelets in infection and inflammation. *J Interfer Cytokine Res* 2002;22:913-922.
140. Klüter H, Müller-Steinhardt M, Danzer S, Wilhelm D, Kirchner H. Cytokines in platelet concentrates prepared from pooled buffy coats. *Vox Sang* 1995;69:38-43.
141. Klüter H, Schlenke P, Müller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H. Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 1997;37:362-367.
142. Kobayashi Y, Ozawa M, Maruo N, Kondo M. Megakaryocytic ploidy in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1993;9:55-61.
143. Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, Ishida T, Shoda E, Miyazaki K, Sunaga S, Horie R, Aoki K, Koike K, Ogata I, Tahasa T, Kato T. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost* 1998;79:1106-1110.
144. Kuijper PH, Gallardo-Torres HI, van der Linden JA, Lammers JW, Sixma JJ, Koendermann L, Zwaginga JJ. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996;87:3271-3281.
145. Kuter DJ and Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85:2720-2730.
146. Lagrue G, Branellec A, Blanc C, Xheneumont S, Beaudoux A, Sobel AT, Weil B. A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernatants from patients with nephrotic syndrome. II. Pharmacological and physicochemical properties. *Biomedicine* 1975;23:73-75.
147. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
148. Lambert MP, Ranova S, Bailly M, Sola-Visner MC, Kowalska MA, Poncz M. PF4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryocytopoiesis: clinical and therapeutic implications. *Blood* 2007;110:1153-1160.
149. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML. Autocrine VEGF signalling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130:691-703.
150. Lemmons PP, Chen D, Berstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 1997;4:1490-1500.
151. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
152. Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* 2000;40:1320-1329.



153. Li X and Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(4):421-26.
154. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 $\beta$  synthesis. *J Cell Biol* 2001;154:485-490.
155. Lindemann S, Tolley ND, Eyre JR, Kraiss LW, Mahoney TM, Weyrich AS. Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. *J Biol Chem* 2001;276:33947-33951.
156. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2007;5:203-211.
157. Lubnitzky S. Die Zusammensetzung des Thrombus in Arterienwunden in den ersten fünf Tagen. *Naunyn-Schmeidebergs Arch Pharmacol* 1885;19:185.
158. Lum H and Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am Physiol* 1994;267:1223-1241.
159. Majno G and Palade GE. Studies on inflammation. I. The effect of histamin and serotonin on vascular permeability: an electron microscope study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:571-606.
160. Man DJ, Ploske H, Winland-Brown JE. The autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and platelet-poor (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plastic Reconstr Surg* 2001;107:229-237
161. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface dependent hemostasis. *Semin Hematol* 1992;29:213-226.
162. Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 1997;46:4-18.
163. Marcus AJ. Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol* 1979;16:188-195.
164. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-896.
165. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glykoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo: *J Exp Med* 2003;197:41-49.
166. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macoice G, Giampaolo A, Hassan HJ. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002;99:888-97.
167. May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 1998;188:1029-1037.

168. May AE, Schmidt R, Kanse SM, Chavakis T, Stephens RW, Schomig A, Preissner KT, Neumann FJ. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood* 2002;100:3611-3617.
169. Maynard DM, Heijen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet  $\alpha$ -granules using mass spectrometry. *Thromb Haemost* 2007;5:1945-1955.
170. Mazur EM. Megakaryocytopoiesis and platelet production: a review. *Exp Hematol* 1987;15:340-350.
171. McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995;86:3668-75.
172. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet specific genes. *Mol & Cell Proteomics* 2004;3:133-144.
173. Menard M, Meyers KM, Prieur DJ. Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb Haemost* 1990;63:127-132.
174. Metzelaar MJ, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 1992;68:378-382.
175. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363-374.
176. Michelson AD. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:121-31.
177. Michelson, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-4936
178. Milner PC, Martin JF. Shortened bleeding time in acute myocardial infarction and its relation to platelet mass. *Br Med J* 1985;290:1767-1770.
179. Mischke R. Thrombozyten. In: Kraft W, Dürr UM, Hrsg. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 4 Aufl. Schattauer: Stuttgart;1997;12:92-100.
180. Mischke R. Physiologie der Blutzellbildung und Blutstillung. In: Mischke R, ed. *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*, 1.Aufl. Schlütersche Verlag: Hannover 2003;1:21-25.
181. Miyamoto-Sato E, Nemoto N, Kobayashi K, Yanagawa H. Specific bonding of puromycin to full-length protein at the C-terminus. *Nucleic Acid Res* 2000;28:1176-1182.
182. Möhle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:663-668.

183. Nachmias VT and Yoshida K-i. The cytoskeleton of the blood platelet: a dynamic structure. *Adv Cell Biol* 1988;2:181-211.
184. Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol* 1997;139:449-57.
185. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinl C, May A, Schömig A. Induction of cytokine expression in leucocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997;95:2387-2394.
186. Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karparkin S. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J Clin Invest* 1991;87:299-336.
187. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zimigib H, Fassler R. Glykoprotein VI but not  $\alpha 2\beta 1$  integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20:2120-2130.
188. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zimigibel H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 2001;193:459-469.
189. Nieswandt B and Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-461.
190. Niewiarowski S. Proteins secreted by the platelet. *Thromb Haemost* 1977;38:924-938.
191. Niewiarowski S, Holt JC, Cook JJ. Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: Coleman RW, Hirsch J, Marder JV and Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott: Philadelphia 1994:546-556.
192. Nissen NN, Poverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-1452.
193. Odell TT, Murphy JR, Jackson CW. Stimulation of megakaryocytopoiesis by acute thrombocytopenia in rats. *Blood* 1976;48:765-75.
194. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021.
195. Olofsson B, Pajusola K, Kapainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana O, Pettersson RF, Alitalo K and Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2576-81.
196. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-1246.
197. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac* 2004;62:555-558

198. Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, Bray PF, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Integrin-dependent control of translation: engagement of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* 1999;144:175-184.
199. Packham MA. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;72:278-284.
200. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326.
201. Perregeaux DG, Barberia J, Lanzetti AJ, Geoghegan KF, Carty M, Gabel CA. IL-1 $\beta$  maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. *J Immunol* 1992;149:1294-1303.
202. Perregeaux DG and Gabel CA. Post-translational processing of murine IL-1 $\beta$ : evidence that ATP-induced release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  occurs via a similar mechanism. *J Immunol* 1998;160:2469-2477.
203. Perregeaux DG, McNiff P, Laliberte L, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 $\beta$  and IL-18 in human blood. *J Immunol* 2002;165:4615-4623.
204. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843.
205. Pletscher A, Da Prada M, Berneis KH, Tranzer JP. New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Experientia* 1971;27:993-1120.
206. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-3806.
207. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:324-332.
208. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151-58.
209. Power CA, Clemetson JM, Clemetson KJ, Wells TN. Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets. *Cytokine* 1995;7:479-482.
210. Prescott S, Zimmermann G, McIntyre T. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor when stimulated by thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;63:580-587.
211. Rabellino EM, Levene RB, Nachman RL, Leung LL. Human megakaryocytes. III. Characterization in myeloproliferative disorders. *Blood* 1994;63:615-22.
212. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000;96:170-175.
213. Ravid K., Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 2002;190:7-20.

214. Reed GL. Platelet Secretion. V Cell signaling in platelet secretion. In: Michelson AD, ed. Platelets. Elsevier Science: San Diego 2002;11:184 -185.
215. Reed GL. Platelet Secretion. VIII Cellular events in exocytosis. In: Michelson AD, ed. Platelets. Elsevier Science: San Diego 2002;11:187.
216. Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P, Flaumenhaft R, Mignatti P. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Dev* 1990;32:313-318.
217. Rinder HM, Tracey JB, Recht M, DeCasto L, Rinder CS, McHugh C, Smith BR. Differences in platelet  $\alpha$ -granule release between normals and immun thrombocytopenic patients and between young and old platelets. *Thromb Haemost* 1998;80:457-62.
218. Roberts WG and Polade GE. Increase microvascular permeability and endothelial fenestration induced by VEGF. *J. Cell Science* 1995;108:2369-2379.
219. Rosenberg S, Stracher A, Lucas R. Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. *J Cell Biol* 1981;91:201-211.
220. Rosenberg S, Stracher A, Burrridge K. Isolation and characterization of a calcium-sensitive  $\alpha$ -actinin-like protein from human platelet cytoskeletons. *J Biol Chem* 1981;256:12986-12991.
221. Rosenberg S and Stracher A. Effect of actin-binding protein on the sedimentation properties of actin. *J Cell Biol* 1982;94:51-55.
222. Rosenwald IB, Pechet L, Han A, Lu L, Pihan G, Woda B, Chen JJ, Szymanski I. Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 $\alpha$  and a potential physiological role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb Haemost* 2001;85:142-151.
223. Rosenwasser LJ, Dinarello CA, Rosenthal AS. Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. *J Exp Med* 1979;150:709-714.
224. Roth GJ. Developing relationship: arterial platelet adhesion glycoprotein Ib and leukine-rich glycoproteins. *Blood* 1991;77:5-19.
225. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997;78:611-616.
226. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-1234.
227. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor platelets and endothelial cell interactions. *Thromb Haemost* 2003;1:1335-1342.
228. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capacity for protein biosynthesis. *Brit J Haematol* 1993;84:451-456.
229. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679-691.

230. Savage B, Sattil S, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glykoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992;267:11300-11306.
231. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-297.
232. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Hematol* 2001;8:270-276.
233. Scher H, Lecine P, Tiwari S, Italiano J jr, Hartwig J, Sivdasani R. A lineage-restricted and divergent  $\beta$  tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of mammalian blood platelets. *Curr Biol* 2001;11:579-586.
234. Schmaier AH. Platelet forms of plasma proteins: plasma cofactors/substrates and inhibitors contained within platelets. *Semin Haematol* 1985;22:187-202.
235. Schöffski P, Tacke F, Trautwein C, Martin MU, Caselitz M, Hecker H, Manns MP, Ganser A. Thrombopoietin serum levels are elevated in patients with hepatitis B/C infection compared to other causes of chronic liver disease. *Liver* 2002;22:114-120.
236. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
237. Seppä HEJ, Grotendorst GR, Seppä SI, Schiffmann E, Martin GR. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 1982;92:584-588.
238. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997;100:91-95.
239. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002;13:247-253.
240. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA. Platelet glycoprotein Ib $\alpha$  is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000;192:193-204.
241. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999;341:738-746.
242. Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol* 1989;169:301-311.
243. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and thrombosis*. Livingstone:Churchill 1994:259-285.
244. Sobel AT, Branellec AI, Blanc CJ and Lagrue GA. Physiochemical characterization of a vascular permeability factor produced by con a-stimulated human lymphocytes. *J Immun* 1977;119:1230-1234.
245. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.

246. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the  $Mg^{2+}$  dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell Biol* 1989;108:1917-1924.
247. Stefanich E, Sennn, Widmer R, Fratino C Keller GA, Fielder PJ. Metabolism of thrombopoietin (TPO) in vivo: determination of the binding dynamics for TPO in mice. *Blood* 1997;89:4063-4070.
248. Tacke F, Trautwein C, Zhao S, Andreett M, Manns MP, Gauser A, Schöffski P. Quantification of hepatic thrombopoietin mRNA transcripts in patients with chronic liver diseases shows maintained gene expression in different etiologies of liver cirrhosis. *Liver* 2002;22:205-12.
249. Thiery JP and Bessis M. Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;242:290-292.
250. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor – multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
251. Tomita Y, Tanahashi N, Tomita M, Itoh Y, Yokoyama M, Takeda H, Schiszler I, Fukuuchi Y. Role of platelet glykoprotein IIb/IIIa in ADP-activated platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro: observation with video-enhanced contrast microscopy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001;24:1-9.
252. Tolentino AR and Bahou WF. Thrombin receptors. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. Elsevier Science: San Diego 2002;8:119+129.
253. Trowbridge EA, Martin JF, Slate DN, Kistik YT, Warren CW, Harley PJ, Woodcock B. The origin of platelet count and volume. *Clin Phys Physiol Meas* 1984;5:145-70.
254. Ts'ao CH. Rough endoplasmatic reticulum and ribosomes in blood platelets. *Scand J Haematol* 1971;8:134-140.
255. Vara J, Perez-Gonzales J, Jimenez A. Biosynthesis of puromycin by streptomyces alboniger. Characterization of puromycin N-acetyltransferase. *Biochemistry* 1985; 24:8074-8081.
256. Veikkola T and Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-220.
257. Velhagen KH, Druegg A, Rieck P. Proliferation and wound healing of retinal pigment epithelium cells in vitro. Effect of human thrombocyte concentrate, serum and PDGF. *Ophthalmol* 1999; 96:77-81.
258. Vestweber D, Blanks JE: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79:181-213.
259. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila M, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5640-5644.
260. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norfol F, Larsen AK, Katz A, Vainchenker W, Debili N. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 1998;91:3711-23.

261. Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl L, Roberts AB, Sporn MB, Wahl SM, Hunt DA. Transforming growth factor type  $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5788-5792.
262. Ward PA, Cunnigham TW, McCulloch KK, Phan SH, Powell J, Johnson KJ. Platelet enhancement of O<sub>2</sub>-response in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 1988;58:37-47.
263. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov, Orpana A, Ristimäki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* 1998;80:171-175.
264. Watson SP. Collagen receptor signaling in platelets and megacaryocytes. *Thromb Haemost* 1999;82:365-376.
265. Watson SP and Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets extending role of the ITAM. *View Immunol Today* 1998;19:260-226.
266. Weiss C, Jelkman W. Thrombozyten, Blutstillung und – gerinnung. In: Schmidt RF, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. 27.Aufl. Springer: Berlin,Heidelberg, New York 1997;21:426-434.
267. Weksler B and Ley CJE. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin trypsin, and the ionophore A23187. *Ann NY Aca Sci* 1986;485:349-36.
268. Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clemetson KJ. Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$  gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:389-395.
269. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996;97:1525-1534.
270. Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *PNAS* 1998;95:5556-5561.
271. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmermann GA. The evolving role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 2003;1:1897-1905.
272. Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND, Kraiss LW, Dixon D, Mahoney TM, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmermann GA. Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Haemost* 2004;30:493-500.
273. White J. Influence of taxol on the response of platelets to chilling. *Am J Pathol* 1982;108:184-195.
274. White JF. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* Philadelphia: J.B. Lippincott Company;1994:397-423.
275. White JG, Clawson CC. The surface-connected canicular system of blood platelets – a fenestrated membrane system. *Am J Pathol* 1980;101:353-364.



276. White JG, Escolar G. The blood platelet open canicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol* 1991;56:233-242.
277. Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RH, Vornhagen R, Clemetson KJ. Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in  $\lambda$ gt11. *Thromb Haemost* 1989;61:448-453.
278. Wilner GD, Nossel HL, Leroy EC. Aggregation of platelets induced by collagen. *J Clin Invest* 1968;47:2616-2621.
279. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3071-3076.
280. Wuthrich C, Deranleau DA, Dubler D, Luscher EF. Human blood platelets secretion: optical multichannel analyzer measurements using acriflavine as a release indicator. *Biochemistry* 1984;23:1224-1229.
281. Yamamoto C, Kaji T, Sakamoto M, Koizumi F. Effect of endothelin on the release of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human endothelial cells and interaction with thrombin. *Thromb Res* 1992;67:619-624.
282. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999;81:1-7.
283. Yeaman MR and Bayer AS. Antimicrobial host defense III. Platelets likely play multiple and key roles in antimicrobial host defense. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. Elsevier Science: San Diego 2002;32:470-474.
284. Zeller PJ, Skalak TC, Ponce AM, Price RJ. *In vivo* chemotactic properties and spatial expression of PDGF in developing mesenteric microvascular networks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2116-H2125.
285. Zhan FW. Untersuchungen über Thrombose: Bildung der Thromben. *Virch Arch Path Anat* 1875;62:81.
286. Zhang W and Colman RW. Thrombin regulates intracellular cyclic ATP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A. *Blood* 2007;110:1475-1482.
287. Zimmermann G, McIntyre T, Prescott SM. Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1985;76:2235-2246.
288. Zimmermann G, McIntyre T, Prescott SM. Thrombin stimulates neutrophil adherence by an endothelial cell-dependent mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1986;485:349-368.
289. Zimmet J and Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol* 2000;28:3-16.
290. Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998;75:780-786.

- 291. <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/317/5845/1767/DC1>  
(Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, George T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, Andrian v UH. Dynamic visualization of thromopoiesis within bone marrow. Science 2007;317:1767-1770)
- 292. <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjmfam>
- 293. <http://www.transfusionsmedizin.uk-erlangen.de>

---

## 9 DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Harald Klüter für die Überlassung des Themas.

Ebenso danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, meine Dissertation vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten, sowie für seine Geduld bei der Durchsicht meines Manuskriptes.

Für die Konzeption und Entwicklung dieser Forschungsarbeit und die fachliche Unterstützung danke ich Herrn Dr. Alex Dugrillon.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Bugert möchte ich mich für seine Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Ohne seine Ideen, Erfahrungen und konstruktive Kritik wäre der Abschluss meiner Dissertation nicht möglich gewesen.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Dr. Ralf Lösel aus dem Institut für klinische Pharmakologie der Fakultät für klinische Medizin der Universität Heidelberg, in Zusammenarbeit mit ihm und unter seiner Anleitung erfolgte die Durchführung der Gelelektrophoresen.

Frau Dr. Karin Bieback und Frau Dr. Susanne Kern danke ich für die Hilfsbereitschaft und die Geduld, die sie mir beim Erlernen der labortechnischen Methoden, trotz Ihrer Belastung in der Forschung, entgegenbrachten.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Lindner, Herrn Ullrich und bei allen Mitarbeitern der Abteilung Produktion des DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH Mannheim für die Einweisung in die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten (auch über die Mittagspause).

Meinem lieben Andreas danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung und Geduld während der Erstellung dieser Arbeit.

---

## 10 ERKLÄRUNG

---

### **Erklärung nach § 10 Absatz 5 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 06. Februar 2002**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurde auf folgender Veranstaltung präsentiert bzw. in folgendem Publikationsorganen veröffentlicht:

37. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Mannheim, Deutschland, 21.-24.09.2004

Dugrillon A, Dobrowolski C, Bugert P, Lösel R, Klüter H (2004).

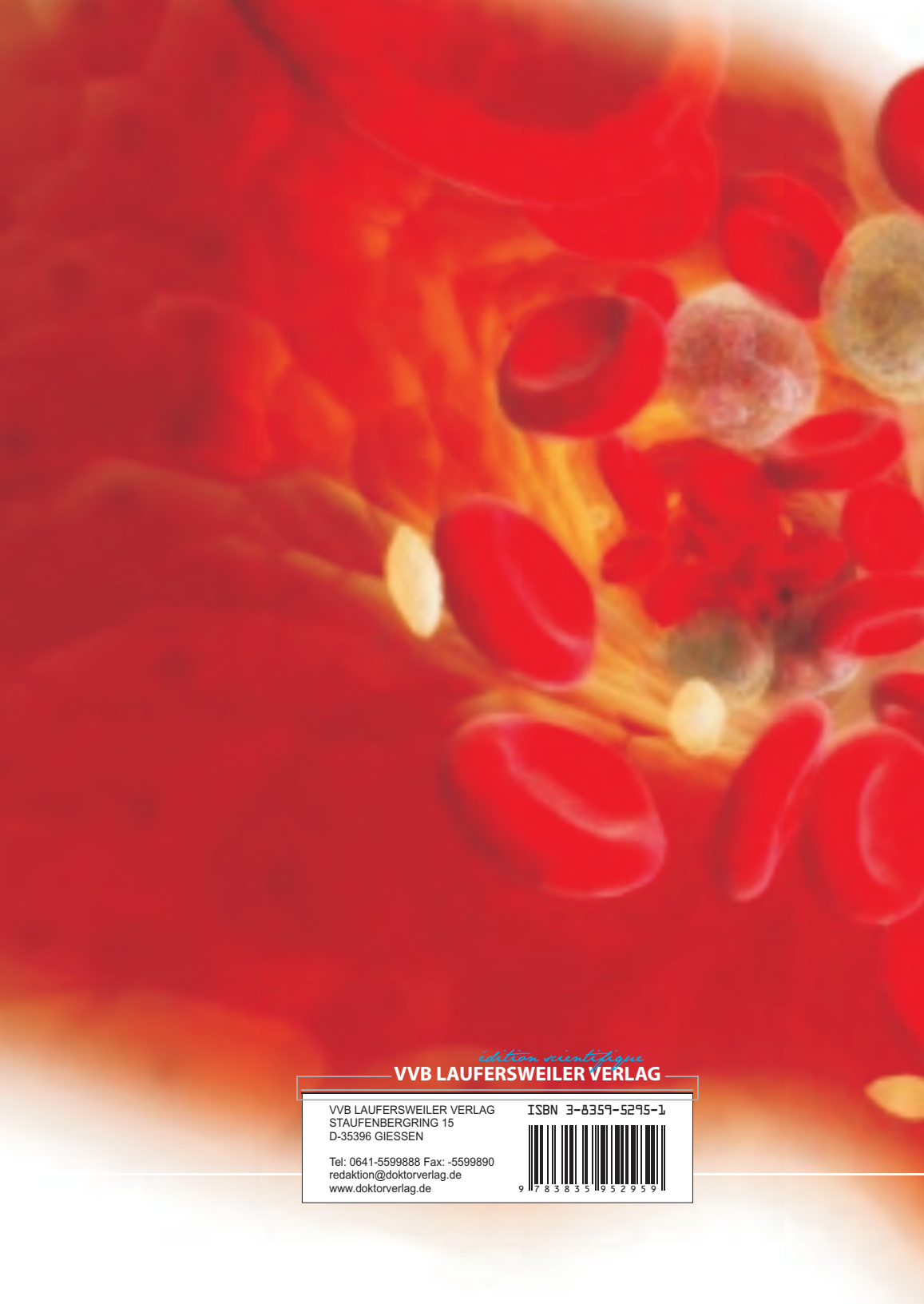
Lack of protein biosynthesis in leukocyte depleted preparations.

Transfus Med Hemother 2004;3:21.

Dugrillon A, Dobrowolski C, Bugert P, Lösel R, Klüter H (2004).

Lack of protein biosynthesis in leukocyte depleted preparations.

Platelets 2004;15:239+488.



*edition wissenschaft*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5295-1

